

Ana Rita de Jesus Nogueira

Licenciada em Biologia

**Otimização da produção de proteínas recombinantes
em culturas de células vegetais: edição de genoma de
células de tabaco BY-2 através de CRISPR-Cas9**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica para a Saúde

Orientador: Doutora Rita Abranches, ITQB NOVA

Setembro 2017

Ana Rita de Jesus Nogueira

Licenciada em Biologia

**Otimização da produção de proteínas recombinantes
em culturas de células vegetais: edição de genoma de
células de tabaco BY-2 através de CRISPR-Cas9**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica para a Saúde

Orientador: Doutora Rita Abranches, ITQB NOVA

Júri:

Presidente: Doutor Pedro Manuel H. M. Matias
Arguente: Prof. Doutora Maria Leonor Mota Morais Cecílio
Vogais: Doutora Margarida Archer Franco Frazão
Doutora Rita Sobral Moutinho Abranches

**Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier
da Universidade Nova de Lisboa**

Setembro 2017

Otimização da produção de proteínas recombinantes em culturas de células vegetais: edição de genoma de células de tabaco BY-2 através de CRISPR-Cas9

Copyright Ana Rita de Jesus Nogueira, ITQB NOVA, UNL

O Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de dedicar este espaço para agradecer às pessoas que contribuíram para a realização da minha tese de mestrado.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao laboratório *Plant Cell Biology*, especialmente à Doutora Rita Abranches por me ter recebido no seu grupo, permitindo-me entrar no mundo da investigação. Obrigada por toda a motivação e interesse demonstrado. Quero ainda agradecer aos meus colegas Ana Sofia Pires, André Folgado, Rita Santos e Bárbara Rebelo por me terem recebido tão bem no laboratório.

Agradeço aos estudantes de doutoramento Denise Coutinho e Gonçalo Covas do laboratório *Bacterial Cell Surfaces and Pathogenesis* por toda a disponibilidade em ajudar-me sempre que precisei, não tenho como agradecer-vos todo o apoio e compreensão.

À minha mãe Adélia, à minha irmã Rute, à minha sobrinha Cláudia e ao meu cunhado Ricardo. Obrigada por todo o apoio que me deram ao longo de todos estes anos, por estarem lá em todos os momentos importantes e pelo facto de me aturarem e partilharem sempre uma palavra amiga e encorajadora quando o meu temperamento se revelava mais difícil. Sempre me direccionaram para o rumo certo. Agradeço do fundo do coração todo o carinho. São os meus heróis.

Agradeço a toda a minha família por todo o incentivo e apoio demonstrado em todas as etapas importantes da minha vida. Adoro-vos! Esta tese é-vos dedicada.

Aos meus amigos Joana Ferreira, Andreia Vieira, Raquel Sousa e Miguel Correia. Nunca esquecerei todas as gargalhadas que partilhámos, mesmo quando os momentos eram mais difíceis. Obrigada por todo o apoio.

Agradeço especialmente à Sara Gomes, por todas as palavras bonitas que sempre me disse ao longo de todos estes anos. Obrigada por sempre me aturares quando estava mais em baixo, por ouvires os meus desabafos e partilhares das minhas alegrias como se fosses as tuas. Espero manter-te sempre comigo.

Um muito obrigado à Leonor Melo pela companhia constante ao longo deste ano difícil. Sempre me ajudaste quando precisei, além de que tantas vezes me aturaste quando o meu mau feitio falava mais alto. Sem ti este ano teria sido tão aborrecido! Foi um prazer conhecer-te e vou sentir a tua falta quando esta etapa acabar.

Finalmente, um agradecimento enorme ao Hugo Cardoso. Obrigada por todo o apoio que sempre me deste em tudo, por me aturares mesmo quando sei que não tenho razão, pela preocupação e interesse sobre todos os aspetos da minha vida (mesmo quando não percebes do que estou a falar), pelo amor e carinho constantes ao longo destes anos. És uma parte muito importante da minha vida, sem ti teria sido mais difícil alcançar os meus objetivos. Agradeço por estares presente nesta etapa importante.

Resumo

A utilização de plantas transgênicas para a produção em larga escala de proteínas recombinantes com valor comercial e farmacêutico tem merecido destaque como alternativa aos sistemas convencionais pois oferece diversas vantagens. Em particular, as culturas de células vegetais em suspensão oferecem as vantagens associadas à produção em planta (como custos reduzidos e segurança) e à produção em sistemas de culturas de células. Apesar de apresentarem várias vantagens, os rendimentos destas culturas ainda não são competitivos quando comparados com os sistemas de culturas de células animais.

Neste projeto, foram utilizadas culturas de células em suspensão *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) que expressam uma proteína humana do tipo lipocalina, prostaglandina D2 sintase (L-PGDS), com o objetivo de tentar aumentar a produção desta proteína recombinante neste sistema vegetal. Neste estudo, foi efetuada uma estratégia de *knock-out* de uma histona desacetilase (HDA6) envolvida em mecanismos epigenéticos. A inativação foi realizada utilizando o sistema de edição de genoma CRISPR-Cas9.

As culturas BY-2 que expressam L-PGDS foram transformadas com um plasmídeo que contém uma endonuclease Cas9 e um RNA guia para a inativação de *HDA6*, componentes necessários para a edição do genoma. Apesar de não ter sido possível estabelecer uma linha transformada que apresentasse um desenvolvimento normal, este estudo foi inovador, uma vez que foi dado o primeiro passo para a manipulação de genomas com vista a aumentar a produção de proteínas recombinantes.

Os resultados preliminares obtidos podem servir como base para trabalhos futuros neste âmbito. Uma vez estabelecida uma linha transgênica sem atividade de HDA6 como prova de conceito, deverá ser gerada uma linha *wild type* sem atividade de HDA6 para posterior transformação com genes que codificam proteínas com valor importante para a indústria farmacêutica.

Termos-chave: *Molecular Farming*, culturas de tabaco BY-2, proteína recombinante, L-PGDS, edição de genoma através de CRISPR-Cas9, histona desacetilase.

Abstract

The use of transgenic plants for large-scale production of recombinant proteins with commercial and pharmaceutical value has emerged as an alternative to conventional systems due to its several advantages. Particularly, plant cell suspension cultures offer the advantages of production in whole plant (such as reduced costs and safety) and production in cell culture systems. Although they have numerous advantages, the yields obtained are not yet competitive enough when compared to animal cell culture systems.

In this project, *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) cell suspension cultures expressing a lipocalin-type human prostaglandin D2 synthase (L-PGDS) were used, with the purpose of increasing production yields in this plant system. In this study, a knock-out strategy of a histone deacetylase (HDA6) involved in epigenetic mechanisms was developed. The inactivation was performed using the genome editing system CRISPR-Cas9.

BY-2 cultures expressing L-PGDS were transformed with a plasmid that contains a Cas9 endonuclease and a guide RNA for the inactivation of *HDA6*, components that are necessary for genome editing. Although it was not possible to establish transformed cell lines displaying a normal development, this was an innovative study, since it is the first step taken for genome editing towards increasing recombinant protein production.

The initial results obtained in this study could contribute to future studies and development in Molecular Farming. Once a transgenic culture without HDA6 activity is established as a proof of concept, a *wild type* culture without HDA6 activity should be created for further transformation with genes encoding valuable proteins for the pharmaceutical industry.

Keywords: Molecular Farming, tobacco BY-2 cultures, recombinant protein, L-PGDS, genome editing by CRISPR-Cas9, histone deacetylase.

Índice

Abreviaturas	XV
I. Introdução	1
1. <i>Molecular Farming</i>	1
2. Plantas como sistema de expressão de proteínas recombinantes	3
2.1. Estratégias de transformação de plantas	6
2.2. Modificações pós-tradução e “humanização” de proteínas recombinantes	7
3. Processos de <i>downstream</i> de culturas de células vegetais para obtenção de proteínas recombinantes	9
4. <i>Nicotiana tabacum</i> como plataforma de expressão de proteínas recombinantes	10
5. Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina	11
6. Modificações epigenéticas	13
6.1. Histona desacetilase 6	15
7. Técnicas de edição de genoma	16
7.1. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated protein-9 nuclease</i> (CRISPR-Cas9)	17
8. Objetivos do projecto	18
II. Materiais e Métodos	21
1. Material Vegetal	21
1.1. Manutenção de culturas de células vegetais em suspensão BY-2	22
2. Caracterização da curva de crescimento da linha BT	22
2.1. Preparação do inóculo inicial de cultura BT para o estudo da curva de crescimento	22
2.2. Filtração a vácuo das culturas celulares	22
3. Análise da expressão da proteína L-PGDS em culturas de BY-2 BT	23
3.1. Quantificação da proteína total utilizando o método de Bradford	23
3.2. Preparação das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	23
3.3. Preparação de SDS-PAGE	24
3.4. Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose	25
3.5. Imunodeteção de L-PGDS	25
4. Sequenciação de <i>HDA6</i>	26
4.1. Extração de DNA genómico de <i>N. tabacum</i> BY-2	26
4.2. Sequenciação do primeiro exão de <i>HDA6</i>	26
5. Obtenção de gRNA1 e gRNA2 e inserção em pFGC-pcoCas9	28
5.1. Purificação de pUC119-gRNA e pFGC-pcoCas9	29
5.2. <i>Overlapping</i> PCR	29
5.3. Digestão do plasmídeo pFGC-pcoCas9 e fragmento gRNA	32

5.4. Ligação de pFGC-pcoCas9 e gRNA	32
6. Preparação de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	33
7. Transformação de <i>E.coli</i> DH5α competentes.....	34
7.1. PCR de colônias de <i>E.coli</i> DH5α transformadas.....	34
8. Preparação de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	35
9. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> EHA105 competentes	36
9.1. PCR de colônias de <i>A. tumefaciens</i> EHA105 transformadas	36
10. Transformação de <i>N. tabacum</i> BY-2 mediada por <i>A. tumefaciens</i>	37
11. Viabilidade celular de <i>N. tabacum</i> BY-2 BT	38
III. Resultados e Discussão	39
1. Caracterização da curva de crescimento de <i>N. tabacum</i> BY-2 que expressa L-PGDS (linha BT)	39
2. Quantificação relativa de L-PGDS presente no meio de cultura de BY-2 BT	40
3. Verificação da sequência de <i>HDA6</i>	40
4. Construção de gRNA1 e gRNA2 por <i>overlapping</i> PCR	42
5. Inserção de gRNA em pFGC-pcoCas9	44
6. Transformação de <i>Agrobacterium</i> com pFGC-pcoCas9+gRNA2	47
7. Transformação da linha BT com pFGC-pcoCas9+gRNA2	48
8. Caracterização das linhas BT transformadas com CRISPR-Cas9.....	49
IV. Conclusões e Perspetivas Futuras	55
V. Bibliografia.....	57
VI. Anexos	65
1. Reagentes e Soluções	65
1.1. Preparação de soluções para géis de proteínas	65
1.2. Preparação de soluções para transferência e detecção de proteínas	66
1.3. Preparação de soluções para extração de DNA.....	67
1.4. Preparação de meios de cultura para cultura de tecidos	67
1.5. Preparação de soluções para microbiologia	68
1.6. Preparação de soluções para géis de DNA.....	68
1.7. Preparação de antibióticos.....	69
1.8. Preparação de soluções para viabilidade celular	70

Índice de figuras

Figura I.1 – Processo de N-glicosilação em células vegetais e humanos.....	9
Figura I.2 – Conversão de prostaglandina H ₂ a prostaglandina D ₂ , catalisada por L-PGDS.....	12
Figura I.3 – Estrutura de CRISPR-Cas9.....	18
Figura II.1 – Plasmídeo pTRA-BT-AH.....	21
Figura II.2 – T-DNA presente no plasmídeo pTRA-BT-AH.	21
Figura II.3 – Aparelho de montagem de géis Mini-PROTEAN Tetra Cell e tina Mini-PROTEAN Tetra Cell.....	24
Figura II.4 – Plasmídeo pUC119-gRNA.....	29
Figura II.5 – Plasmídeo pFGC-pcoCas9.	29
Figura II.6 – Criação de gRNA a partir de uma estratégia de <i>overlapping</i> PCR	30
Figura II.7 - <i>Master plate</i> de EHA105.	37
Figura III.1 – Curva de crescimento e quantidade de proteína total solúvel secretada para o meio de cultura da linha BT.	39
Figura III.2 – Análise de L-PGDS no meio de cultura de BY-2 BT	40
Figura III.3 – Gel PCR do primeiro exão de <i>HDA6</i>	41
Figura III.4 - Alinhamento com <i>primer forward</i> de <i>HDA6</i> e sequência fornecida.	42
Figura III.5 – Gel PI de gRNA1 e gRNA2.....	43
Figura III.6 – Gel PF de gRNA1 e gRNA2.....	43
Figura III.7 – Gel PCR de pFGC-pcoCas9+gRNA2.....	44
Figura III.8 Gel PCR de colónias de DH5 α transformadas com pFGC-pcoCas9+gRNA1.....	45
Figura III.9 – Gel PCR de colónias de pFGC-pcoCas9+gRNA1+gRNA2	45
Figura III.10 – Gel PCR de colónias de pFGC-pcoCas9+gRNA1+gRNA2.	46
Figura III.11 – Gel de agarose 0.8%..	47
Figura III.12 – Gel de agarose 1.6%.	47
Figura III.13 – Gel PCR de colónias de pFGC-pcoCas9+gRNA2.....	47
Figura III.14 – Passos de transformação de BY-2 BT com pFGC-pcoCas9+gRNA2.	49

Figura III.15 – Gel PCR de pFGC-pcoCas9+gRNA2	50
Figura III.16 – Anomalias observadas na morfologia celular da linha 6	51
Figura III.17 – Morfologia celular da linha BT.....	51
Figura III.18 – Viabilidade celular da linha 6 e linha BT.	52
Figura III.19 – Agregação celular da linha 6.....	52

Índice de tabelas

Tabela I.1 - Exemplos de empresas/institutos que utilizam <i>Molecular Farming</i> para produzir biofármacos para a saúde humana.....	2
Tabela I.2 - Comparação de diferentes sistemas de expressão para a produção de proteínas recombinantes.	6
Tabela II.1 – Preparação dos géis de concentração e resolução SDS-PAGE 12.5%.	24
Tabela II.2 – <i>Primers</i> utilizados para sequenciação de <i>HDA6</i>	27
Tabela II.3 – <i>Master mix</i> para PCR.....	28
Tabela II.4 – Programa de PCR utilizado no termociclador.	28
Tabela II.5 – <i>Primers</i> utilizados para construção de gRNA1 e gRNA2..	30
Tabela II.6 – <i>Master mix</i> para <i>overlapping</i> PCR.....	31
Tabela II.7 – Programa de PCR utilizado no termociclador.	31
Tabela II.8 – Digestão de pFGC-pcoCas9, gRNA1 e gRNA2.....	32
Tabela II.9 – Ligação de pFGC-pcoCas9 com gRNA.....	33
Tabela II.10 – <i>Master mix</i> para PCR de colónias de <i>E.coli</i> DH5 α	35
Tabela II.11 – Programa de PCR utilizado para PCR de colónias de DH5 α para amplificação de gRNA.	35

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
APS	Persulfato de amônio
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	Albumina de soro bovino
BY-2	Células de Tabaco Bright Yellow-2
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPR-Cas9	<i>CRISPR-associated Cas9 protein nuclease</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminatetracetato
HDA6	Histona desacetilase 6
L-PGDS	Prostaglandina D Sintase do tipo Lipocalina
LB	Meio Luria-Bertani
MS	Meio Murashige & Skoog
MW	Peso Molecular
NBT	Nitroazul de tetrazólio
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	PBS com Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TBE	Tris/Borato/EDTA
T-DNA	Ácido Desoxirribonucleico de Transferência
TEMED	Tetrametiletenodiamina
cDNA	DNA complementar
MAR	<i>Matrix Attachment Regions</i>

I. Introdução

1. *Molecular Farming*

Desde os primórdios da civilização até aos dias de hoje, as plantas têm sido essenciais para o bem-estar humano e do planeta. Desde a alimentação ao vestuário, da indústria cosmética à farmacêutica, todos estes sectores dependem direta ou indiretamente de plantas. O uso de plantas na medicina está documentado desde a altura dos egípcios, desde 1600 a.C., quando foi compilada uma lista com mais de 700 plantas adequadas para uso medicinal (Fischer & Emans, 2000). Atualmente, os princípios ativos da maioria das plantas documentadas já foi descoberto e perto de um quarto dos medicamentos prescritos hoje em dia ainda são de origem vegetal (Fischer & Emans, 2000). Devido à evolução da biotecnologia, o uso de plantas na medicina tem um impacto cada vez maior (Fischer & Emans, 2000).

Existem diversos sistemas de expressão para produção de proteínas recombinantes, como bactérias, células de mamífero, células de inseto, leveduras, fungos filamentosos e sistemas vegetais (Dingermann, 2008; Gellissen et al., 2006; Schmidt, 2004). No caso das plantas, a produção de proteínas recombinantes em sistemas vegetais geneticamente modificados em que o gene introduzido codifica o produto desejado denomina-se de *Molecular Farming* (Oakes et al., 1991). Desde a primeira vez que uma planta superior foi transformada com sucesso para a produção de uma proteína para fins farmacêuticos (Hiatt et al., 1989), vários genes foram introduzidos em plantas para a produção de proteínas heterólogas, tais como anticorpos, proteínas farmacêuticas, proteínas industriais (enzimas), antígenos para vacinas comestíveis (antígenos específicos produzidos em plantas que induzem uma resposta imunitária humoral quando ingeridas por humanos ou animais) e biopolímeros que podem ser importantes para a medicina regenerativa, manipulação de tecidos e indústria alimentar (Horn et al., 2004; Xu et al., 2016).

Atualmente existem diversos biofármacos produzidos em plantas e outras plataformas vegetais através da tecnologia de expressão heteróloga de proteínas (Tabela I.1). Em Maio de 2012, foi aprovado o primeiro biofármaco produzido em células vegetais em suspensão de cenoura, conhecido como ElELYso® ou taliglucerase alfa, desenvolvido pela empresa Protalix Biotherapeutics (<http://www.elelyso.com>). A taliglucerase alfa é uma enzima β -glucosidase expressa em células de cenoura utilizada para o tratamento da doença de Gaucher. As células são cultivadas em biorreatores descartáveis de grande volume. Os biorreatores são adequados à produção de diversos compostos terapêuticos em diversos tipos de células, como anticorpos e enzimas complexas e têm como vantagens a capacidade de proporcionar às culturas de células vegetais em suspensão condições ótimas para a produção de proteínas recombinantes a baixo custo, facilidade de *scale-up* ou *scale-down* (adicionando ou removendo biorreatores descartáveis) e garantem ainda a uniformidade e segurança do produto obtido, permitindo a

produção de proteínas recombinantes de acordo com um sistema de boas práticas de fabrico (Tekoah et al., 2015).

Tabela I.1 - Exemplos de empresas/institutos que utilizam *Molecular Farming* para produzir biofármacos para a saúde humana (adaptado de Yao et al., 2015).

Empresa/Instituto	Organismo hospedeiro	Produto	Tecnologia utilizada	Vantagem
Mapp Biopharmaceutical/ LeafBiol, EUA	Folhas de tabaco	ZMapp™	Expressão transiente MagnICON	Rapidez
Protalix, Carmiel, Israel	Células de cenoura	ELELYSO™	Expressão estável ProCellEx®	Qualidade
Icon Genetics, Munique, Alemanha	Folhas de <i>N. benthamiana</i>	Vacina para linfoma não-Hodgkin	Expressão transiente MagnICON	Rapidez e personalização
Ventria Bioscience, EUA	Sementes de arroz	VEN150	Expressão estável Express Tec	Custo de <i>scale</i>
Greenovation Biotech, Heilbronn, Germany	Musgo	Moss-GAA, Moss-GBA, Moss-AGAL	Biotechnology baseada em <i>Physcomitrella patens</i>	Rapidez de <i>scale</i> e personalização
PhycoBiologics Inc., Bloomington, EUA	Algas	Vacinas, fatores de crescimento e enzimas	Expressão de microalgas	Rapidez de <i>scale</i>
Medicago, Quebec, Canadá	<i>N. benthamiana</i>	Vacina para influenza, raiva e rotavírus	Expressão transiente Proficia™; expressão estável	Rapidez
Synthon, Nijmegen, Holanda	<i>Lemna minor</i>	Anticorpo para linfoma não-Hodgkin	Expressão estável Sistema LEX	Qualidade
Fraunhofer IME, Aachen, Alemanha	Folhas de tabaco	Anticorpo para VIH	Expressão nuclear estável	Custo de <i>scale</i>
Fraunhofer CMB/iBio, Newark, EUA	Folhas de <i>N. benthamiana</i>	Vacina para influenza	Expressão transiente	Rapidez
Healthgen, Wuhan, China	Sementes de arroz	Soro de albumina	Expressão estável	Qualidade de <i>scale</i>
PlanetBiotechnology, Hayward, EUA	Folhas de tabaco	CaroRx para cáries; Anticorpo PBI-220 para antrax; DPP4-Fc para infecção por coronavírus	Expressão estável	Qualidade de <i>scale</i>

2. Plantas como sistema de expressão de proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes produzidas para a indústria farmacêutica precisam de ser altamente purificadas e bem caracterizadas. Como já foi referido anteriormente, existem sistemas de expressão para produção de proteínas recombinantes procariotas (bactérias) e eucariotas (células de mamífero, células de inseto, leveduras, fungos filamentosos e sistemas vegetais).

Os sistemas de expressão bacterianos para a produção de proteínas são uma alternativa economicamente atrativa devido à sua capacidade de crescerem muito rapidamente e a grande densidade devido ao seu tempo de geração curto em substratos económicos (Schmidt, 2004; Terpe, 2006). O genoma de muitas estirpes está também bem caracterizado e existe um número cada vez mais variado de estirpes hospedeiras mutantes e vetores de clonagem (Terpe, 2006). A bactéria *Escherichia coli* é o organismo mais utilizado para a produção heteróloga de proteínas. Esta bactéria gram-negativa tem a capacidade de acumular proteínas recombinantes em mais de 20% do seu conteúdo proteico total (Schmidt, 2004). No entanto, esta espécie tem como desvantagem o facto de acumular endotoxinas prejudiciais a humanos e outros mamíferos, o que exige a presença de um processo de purificação extra para a sua remoção (Terpe, 2006). A principal desvantagem dos sistemas de expressão bacterianos é a de não efetuarem a glicosilação das proteínas recombinantes, o que faz com que proteínas naturalmente glicosiladas necessitem de sofrer modificações pós-tradução posteriormente (Schmidt, 2004). Uma forma de ultrapassar o problema da glicosilação é produzir este tipo de proteínas recombinantes em sistemas de expressão eucariotas que executem corretamente a glicosilação (Schmidt, 2004).

Muitos dos biofármacos que necessitam de glicosilação são produzidos em culturas de células de mamíferos. Apesar de ser um sistema de expressão mais dispendioso que os sistemas bacterianos, as células de mamíferos possuem a capacidade de efetuar modificações pós-tradução semelhantes às modificações que ocorrem no corpo humano (Buyel, 2015). A sinalização para a síntese, processamento e secreção de proteínas humanas são reconhecidos pelas células de mamífero, apesar de existirem diferenças entre tipos diferentes de células (por exemplo, células de ovário de hamster chinês, células de mieloma murino e células embrionárias de rim humano). As principais desvantagens deste sistema são o seu custo elevado, possíveis contaminações com vírus e utilização de tecnologia complexa que exige pessoal altamente qualificado (Khan, 2013).

As células de inseto infetadas com baculovírus são mais resistentes ao *stress*, mais fáceis de manipular e possuem um rendimento superior quando comparadas com células de mamíferos. Os organismos hospedeiros para a infeção com baculovírus são artrópodes, normalmente insetos, sendo o organismo *Autographa californica* o mais utilizado (Jarvis, 2009). Além dos elevados níveis de rendimento de proteínas recombinantes, raramente existe a formação de corpos de inclusão, característica que é comum nos sistemas bacterianos. Possuem ainda a capacidade de fazer modificações como fosforilação e glicosilação (Jarvis, 2009). No entanto, as vias de

processamento de proteínas em células de inseto não são iguais às de eucariotas superiores. Existem diversas desvantagens associadas a este tipo de sistema, como efeitos adversos nas funções de processamento, *folding* e secreção das células de inseto devido à infecção com baculovírus, que pode ter efeitos imunogénicos. Outra desvantagem está relacionada com a elevada atividade proteolítica, o que implica uma aplicação contínua de inibidores de proteases no meio de cultura e resulta num custo económico acrescido (Jarvis, 2009; Schmidt, 2004).

As leveduras apresentam várias vantagens como sistema de expressão: possuem uma vasta gama de estirpes modificadas; algumas espécies, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, já estão bem caracterizadas e, assim como as bactérias, possuem um crescimento acelerado em substratos económicos, o que faz com que o processo de otimização e produção de proteínas recombinantes seja mais rápido e eficiente neste sistema; são ainda organismos não patogénicos (Bill, 2014). Enquanto *S. cerevisiae* é a levedura mais bem caracterizada, a levedura *P. pastoris* é a mais utilizada para expressão heteróloga de proteínas (Schmidt, 2004). Apesar de possuírem vias de modificações pós-tradução complexas, apresentam taxas de secreção reduzidas originadas por uma elevada capacidade de glicosilação, uma vez que a glicosilação exerce um papel ao nível da eficiência de secreção (Schmidt, 2004). No entanto, existem algumas estratégias que podem aumentar a eficiência de secreção, como mutações em genes que aumentam a secreção, supressão de funções que levam ao bloqueamento de funções de secreção e redução da atividade proteolítica em vesículas de secreção (Schmidt, 2004).

Outra plataforma alternativa para a produção de proteínas recombinantes são sistemas fúngicos. Os fungos filamentosos combinam as vantagens das leveduras e bactérias no que diz respeito a fermentações simples e possuem ainda a capacidade de secretar proteínas. Além disso, os processos de *downstream* não necessitam de disrupção celular uma vez que as proteínas recombinantes são secretadas para o meio de cultura (Gellissen et al., 2006; Nevalainen & Peterson, 2014). Apesar de terem uma competência de glicosilação superior às leveduras e de glicosilarem as proteínas recombinantes de forma semelhante às células de mamífero, não são capazes de adicionar o ácido siálico terminal, algo que é funcionalmente importante e que ocorre nas células de mamífero (Nevalainen & Peterson, 2014; Schmidt, 2004). O potencial de secreção de proteínas homólogas é superior nos fungos comparativamente a qualquer sistema de expressão atual, mas a secreção de proteínas recombinantes tem um rendimento muito inferior, o que pode ser causado por modificações e processamentos incorretos ou *misfolding* que resultam na eliminação dos produtos desejados por mecanismos de controlo de qualidade celular (Schmidt, 2004). É necessário proceder a uma investigação mais aprofundada sobre a sua fisiologia, metabolismo, relações entre a fisiologia e produtividade consequente, entre outros.

A expressão heteróloga de proteínas em plantas oferece diversas vantagens. Uma das principais vantagens é a sua segurança em relação aos restantes sistemas de expressão, pois não existe o perigo de contaminação com patogénios humanos ou animais, sequências de DNA oncogénico

ou endotoxinas que possam pôr em risco a saúde humana (Daniell et al., 2001; Dirisala et al., 2017; Moustafa et al., 2015; Schillberg et al., 2002; Wilson & Roberts, 2012; Xu et al., 2012). Existem ainda vantagens a nível económico: é mais barato produzir proteínas recombinantes em plantas quando comparativamente aos sistemas de células animais (Horn et al., 2004; Twyman et al., 2003); não existe necessidade de adquirir aparelhos para fermentação nem de contratar pessoal altamente qualificado para os gerir (Horn et al., 2004; Twyman et al., 2003); quando o produto desejado é secretado para o meio de cultura ou quando a proteína recombinante pode ser utilizada em material pouco ou nada processado, o custo do processo de *downstream* reduz-se significativamente e por vezes o processo de purificação pode ser totalmente eliminado quando o material vegetal que contém a proteína recombinante deve ser ingerido (Daniell et al., 2001); a rapidez com que é efetuado o *scale-up* ou *scale-down* de plantas em relação a animais transgénicos é vantajoso do ponto de vista económico (Twyman et al., 2003). Todo o processo de plantação, colheita e processamento do material vegetal já está otimizado e já existe tecnologia disponível para todo este processo, o que apresenta outra vantagem (Horn et al., 2004). Por último, as plantas superiores têm a capacidade de sintetizar proteínas glicosiladas, pois possuem a capacidade de efetuar modificações pós-tradução (Buyel, 2015; Horn et al., 2004; Moustafa et al., 2015). No entanto, existem algumas diferenças entre células vegetais e células humanas a nível da glicosilação proteica, tema que irá ser aprofundado posteriormente. Existem ainda desvantagens como o longo tempo necessário para gerar uma linha transgénica estável, problemas de contaminações por fertilizantes, impactos na produção devido a pragas, doenças e condições climáticas e dificuldade em implementar boas práticas de fabrico (Xu et al., 2011).

Atualmente existem diversas plataformas de produção em plantas: culturas agrícolas, sementes, células vegetais em suspensão, musgos, microalgas e *hairy roots* (Moustafa et al., 2015). A escolha da melhor plataforma de produção a utilizar tem que ser ponderada considerando as vantagens e desvantagens de cada uma, pois não existe uma única plataforma que englobe todas as vantagens necessárias em todas as situações.

As culturas de células vegetais em suspensão combinam as vantagens das plantas com as de culturas microbianas, uma vez que possuem a capacidade de efetuarem mudanças pós-tradução semelhantes às células de mamífero. O seu crescimento é rápido (existem culturas em que a taxa de duplicação é de 24-48 horas) e a manutenção é feita em meio de cultura com componentes de baixo custo económico (Santos et al., 2016). Ao contrário de plantas cultivadas em campo aberto, as culturas de células vegetais em suspensão não dependem das condições climáticas, da qualidade do solo nem do fotoperíodo inerente a cada estação do ano (Hellwig et al., 2004). Além disso, não possuem riscos de contaminação com micotoxinas, herbicidas ou pesticidas e o isolamento e purificação do produto desejado utilizam procedimentos mais simples que em plantas, especialmente quando o produto é secretado para o meio de cultura, sendo por isso mais fácil de implementar boas práticas de fabrico ao longo de todo o processo de produção (Hellwig

et al., 2004). Apesar de todas as vantagens apresentadas, os baixos rendimentos de proteína recombinante obtidos apresentam um problema; no entanto, já existem várias abordagens para aumentar o rendimento: aumentar os níveis de expressão transgênica; aumentar a taxa de transcrição para aumentar a expressão proteica; aumentar a eficiência da tradução; minimizar a degradação de proteínas por proteases; modificar as condições em que as culturas se encontram estabelecidas, entre outras (Xu et al., 2011).

As características de cada sistema de expressão encontram-se representadas na Tabela I.2.

Tabela I.2 - Comparação de diferentes sistemas de expressão para a produção de proteínas recombinantes (adaptado de Yao et al., 2015). * - Em relação a células humanas.

	Plantas transgênicas	Culturas de células vegetais	Bactérias	Leveduras	Culturas de células animais	Animais transgênicos
Custo geral	Muito baixo	Médio	Baixo	Médio	Elevado	Elevado
Capacidade de scale-up	Muito elevada	Média	Elevada	Elevada	Muito baixa	Baixa
Escala de produção	Mundial	Limitada	Limitada	Limitada	Limitada	Limitada
Rendimento proteico	Elevado	Elevado	Médio	Elevado	Médio-Elevado	Elevado
Eficácia do folding da proteína	Elevada	Elevada	Baixa	Média	Elevada	Elevada
Glicosilação	Poucas diferenças*	Poucas diferenças*	Nenhuma	Incorreta	Correta	Correta
Qualidade do produto	Elevada	Elevada	Baixa	Média	Elevada	Elevada
Risco de contaminação	Baixa	Baixa	Endotoxinas	Baixa	Vírus, príons, DNA oncogénico	Vírus, príons, DNA oncogénico
Segurança	Elevada	Desconhecida	Baixa	Desconhecida	Média	Elevada
Custo de armazenamento	Baixo	Moderado	Moderado	Moderado	Elevado	Elevado

2.1. Estratégias de transformação de plantas

Existem dois tipos de estratégia para transformação de plantas com o objetivo de produzir proteínas recombinantes: expressão estável e expressão transiente.

A transformação estável em plantas, nomeadamente transformação nuclear, é o método de expressão mais utilizado. As plantas podem ser transformadas por transformação nuclear ou de plastídeos. A transformação nuclear em plantas possui vantagens em termos de escalabilidade, uma vez que possam ser cultivadas a uma escala agronómica. O mesmo não acontece em culturas de células em suspensão, pois estão confinadas ao tamanho e volume do biorreator onde se encontram (Horn et al., 2004). Após a transformação, a incorporação do transgene no genoma

mantém-se estável, um requisito que é geralmente imposto pelas entidades reguladoras. As linhas transgênicas podem ser estabelecidas por transformação de culturas em suspensão ou de *callus* utilizando como vetores estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* ou utilizando métodos físicos, como bombardeamento de partículas (Horn et al., 2004). No caso de plantas, as linhas transgênicas estáveis demoram vários meses a ser produzidas e a ser efetuado o *scale-up* para ser possível produzir em grande escala, o que não é adequado para situações de respostas a emergências como surtos inesperados (Buyel, 2015). Este tempo de espera pode ser reduzido se for utilizada uma estratégia de expressão transiente (Buyel, 2015; Santos et al., 2016)

A expressão transiente é mais rápida que a transformação estável, o que permite a acumulação de quantidades razoáveis de proteína recombinante num curto período de tempo, ideal para respostas imediatas a surtos inesperados (por exemplo, o surto de ébola em Dezembro de 2013, Xu et al., 2016), sem transformação permanente do genoma da planta (o DNA transgênico é degradado em apenas alguns dias) (Buyel, 2015). Apesar disso, os sistemas de expressão transiente têm rendimentos mais variáveis quando comparados com sistemas estáveis, o que pode não estar de acordo com o esperado pelas entidades reguladoras e determinar se o produto desejado pode ou não ser comercializado (Buyel, 2015). O produto necessita de ser processado rapidamente pois o armazenamento na planta a longo prazo causa a degradação do produto (Horn et al., 2004; Moustafa et al., 2015). Existem várias maneiras de expressar proteínas recombinantes de forma transiente, como agroinfiltração ou utilização de vetores virais (Buyel, 2015).

2.2. Modificações pós-tradução e “humanização” de proteínas recombinantes

As modificações pós-tradução (MPT) são ligações covalentes que não modificam a estrutura primária de proteínas que incluem a adição e remoção reversível de grupos funcionais (Sun et al., 2006). As MPT podem ser processos como glicosilação, fosforilação, acilação, metilação, nitração e ubiquitinação – processos intracelulares responsáveis por fenómenos de expressão génica, tráfego vesicular endossomal e transdução de sinal (Gomord & Faye, 2004; Sun et al., 2006); no entanto, processos como processamento proteolítico, a formação de pontes dissulfureto e glicosilação contribuem diretamente para a função de biofármacos. Estas modificações inerentes aos biofármacos influenciam diversos aspetos da proteína: induzem mudanças estruturais e modulam a atividade, localização subcelular, estabilidade, imunogenicidade e interações com outras moléculas (Ko et al., 2008; Walsh & Jefferis, 2006).

A glicosilação representa o tipo de modificação mais relevante em proteínas biofarmacêuticas (Walsh & Jefferis, 2006). A glicosilação é definida como um processo no qual um hidrato de carbono dador se liga a um grupo hidroxilo (-OH) ou a outro grupo funcional de outra molécula (Amaro et al., 2016). Cerca de 50% das proteínas humanas são glicosiladas (Walsh & Jefferis, 2006) e por isso é importante escolher um sistema de expressão eucariota (como referido

anteriormente, as bactérias não têm capacidade para efetuar MPTs). Outro aspeto a ter em consideração é o tipo de oligossacárido (glicoforma) associado para cada proteína, uma vez que pode ter um impacto a nível do *folding*, estabilidade, tráfego, imunogenicidade e até na atividade funcional (Walsh & Jefferis, 2006).

Existem dois tipos de glicosilação: N-glicosilação e O-glicosilação. Os O-glicanos são oligossacáridos que são ligados a um polipéptido através de um átomo de oxigénio de um grupo hidroxilo (Pinho & Reis, 2015). Os O-glicanos do tipo mucina são encontrados em muitas glicoproteínas e, juntamente com os resíduos de xilose O-ligados a serina ou treonina em proteoglicanos, são os mais abundantes O-glicanos em humanos. Os O-glicanos têm influência nos níveis de *folding*, solubilidade e resistência ao calor ou proteólise de proteínas (Gomord et al., 2010). Os N-glicanos são oligossacáridos ligados covalentemente a um resíduo de asparagina de uma proteína (Faye et al., 2005; Pinho & Reis, 2015). Em todas as células eucariotas, a N-glicosilação começa no retículo endoplasmático. Ao longo do transporte através da via secretora, o N-glicano sofre diversos processos de maturação (Figura I.1). No final do complexo de Golgi, a maturação para células de mamífero e vegetais diferem, pois é adicionado $\alpha(1,6)$ -fucose e em seguida são adicionados $\beta(1,4)$ -galactose e ácido siálico nos mamíferos. Em plantas é adicionado $\alpha(1,3)$ -fucose e $\beta(1,2)$ -xilose e em seguida $\alpha(1,4)$ -fucose e $\beta(1,3)$ -galactose (Faye et al., 2005; Gomord et al., 2010).

A sialilação da proteína é uma glicoforma que contribui para as propriedades farmacocinéticas de muitas proteínas recombinantes com valor terapêutico. Ao contrário das células de mamífero, as plantas não possuem sialiltransferases. Nas plantas, a adição constante de $\alpha(1,3)$ -fucose e $\beta(1,2)$ -xilose no complexo de Golgi no processo de maturação dos glicanos não é desejável, pois estes açúcares podem ter um efeito imunogénico ou alergénico em humanos. No entanto, no caso do primeiro fármaco aprovado e produzido em células vegetais em suspensão de cenoura, taliglucerase alfa, os glicanos não foram modificados, uma vez que os diversos estudos efetuados não mostraram comprometimento da segurança ou eficácia deste biofármaco (Tekoah et al., 2015).

Quando é necessário ultrapassar este problema, podem manipular-se os N-glicanos das plantas para produzirem proteínas recombinantes “humanizadas”, permitindo assim a sua administração em humanos e animais sem efeitos adversos. Em termos de N-glicosilação, existem várias estratégias que podem ser aplicadas. Uma das principais é a prevenção da síntese de resíduos não humanos através da inibição de $\beta(1,2)$ -xilosiltransferase e $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferase por *knock-down/knock-out* ou mutagénesis (Strasser et al., 2014).

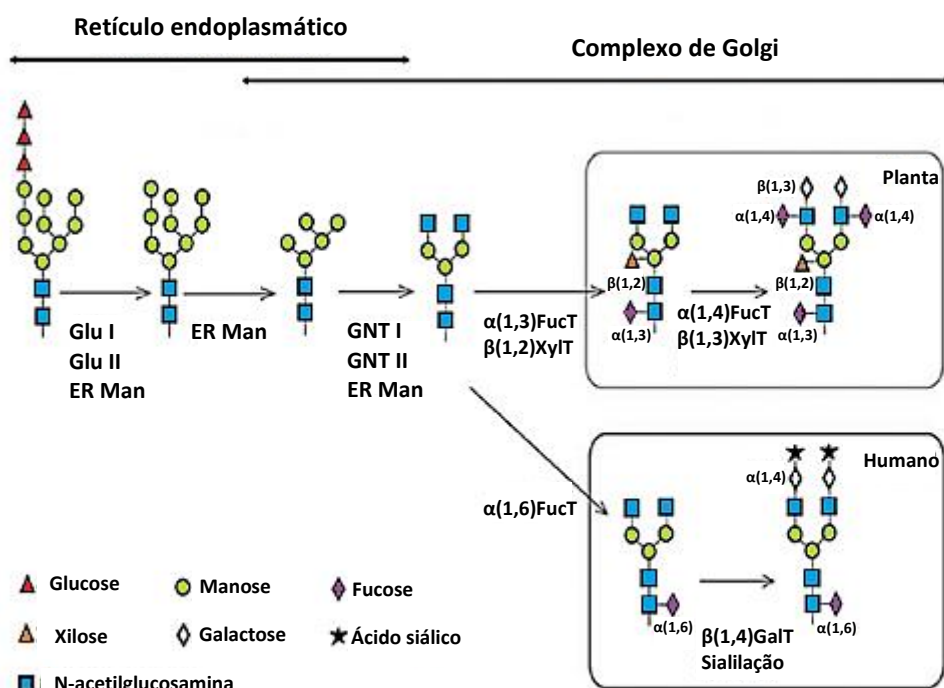


Figura I.1 – Processo de N-glicosilação no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi em células vegetais e humanos (adaptado de Ko et al., 2008). Abreviaturas: Glu I – glucosidase I; Glu II – glucosidase II; ER – retículo endoplasmático; Man – manosidase; GNT I – N-acetilglucosaminatransferase I; GNT II – N-acetilglucosaminatransferase II; $\beta(1,2)\text{XylT}$ – $\beta(1,2)$ -xilosiltransferase; $\alpha(1,3)\text{FucT}$ – $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferase; $\beta(1,3)\text{GalT}$ – $\beta(1,3)$ -galactosiltransferase; $\alpha(1,4)\text{FucT}$ – $\alpha(1,4)$ -fucosiltransferase; $\beta(1,4)\text{GalT}$ – $\beta(1,4)$ -galactosiltransferase.

Uma abordagem alternativa para evitar a acumulação destes açúcares é reter as proteínas recombinantes no retículo endoplasmático para impedir a glicosilação com $\alpha(1,3)$ -fucose e $\beta(1,2)$ -xilose da proteína recombinante. Esta retenção é possível através da introdução de um péptido sinal de retenção no C-terminal da proteína. Contudo, já foram relatadas situações de retenção incompleta de proteínas recombinantes no retículo endoplasmático, o que resulta em proteínas com um perfil de N-glicosilação muito heterogêneo (Castilho & Steinkellner, 2012; Gomord et al., 2010; Ko et al., 2008).

Outra abordagem importante é a introdução de N-glicanos presentes na glicosilação humana, como $\alpha(1,6)$ -fucose, $\beta(1,4)$ -galactose e ácido siálico (Gomord et al., 2010).

3. Processos de *downstream* de culturas de células vegetais para obtenção de proteínas recombinantes

Os processos de *downstream* contabilizam a maior porção dos custos de produção de biofármacos obtidos por *Molecular Farming*, uma vez que representam cerca de 80% dos custos associados (Buyel, 2015; Fischer et al., 2012). A eficiência é influenciada pela concentração da proteína recombinante, a complexidade dos extratos celulares ou meio de cultura e a pureza

requerida para o produto desejado. O *downstream* é dividido em duas fases: recuperação e purificação (Wilken & Nikolov, 2012). O facto de ser um processo dispendioso exige uma otimização das técnicas de recuperação e purificação para diminuir o custo de processamento e, para cada plataforma, tem de ser criado um protocolo específico (Wilson & Roberts, 2012; Yao et al., 2015). Em relação a culturas de células vegetais em suspensão, não existe a necessidade de adicionar passos para a remoção de fibras e óleos, características apenas presentes em plantas (Hellwig et al., 2004).

A recuperação primária consiste na maximização do rendimento de proteína recombinante presente no extrato celular ou meio de cultura e preparação dos produtos obtidos para purificação. O processo de purificação inicia-se com um passo de captura para concentrar a proteína recombinante e para remoção de impurezas que influenciam o nível de rendimento, qualidade e/ou eficiência de purificação da proteína. As proteínas recombinantes são mais fáceis de purificar a partir de células em suspensão se forem secretadas para o meio de cultura; no entanto, geralmente são obtidos rendimentos mais elevados quando a proteína é retida na célula, e por isso deve ser bem ponderada a escolha da célula secretar ou reter a proteína (Fischer et al., 2015). Quando é necessário um elevado nível de pureza da proteína recombinante, são necessários passos adicionais de purificação para remoção de algumas impurezas e para manter uma elevada qualidade do produto desejado (Wilken & Nikolov, 2012).

4. *Nicotiana tabacum* como plataforma de expressão de proteínas recombinantes

A planta *Nicotiana tabacum* é originária da América do Sul e pertence à família das solanáceas. É alotetraploide e pensa-se que foi originada a partir de hibridação interespecífica entre *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tomentosiformis* (Aoki & Ito, 2000; Rushton et al., 2008).

A planta do tabaco é empregue com sucesso para *Molecular Farming* e é a espécie mais comum para a produção de proteínas recombinantes (Xu et al., 2016). O tabaco tem como vantagens o facto de possuir tecnologias bem estabelecidas para transferência e expressão génicas, possui um elevado rendimento de biomassa, produção de grandes quantidades de sementes e a existência de infraestruturas de processamento a grande escala (Xu et al., 2012). Como esta planta não é comestível, não existe o risco de contaminação de cadeias alimentares com componentes naturais do tabaco, o que é uma vantagem pois minimiza obstáculos a nível regulatório. O tabaco possui elevados níveis de alcalóides tóxicos, como nicotina; no entanto, existem variedades com baixos níveis de alcalóides que podem ser utilizadas para a produção de proteínas recombinantes (Xu et al., 2012). Como alternativa podem ser usadas culturas de células vegetais em suspensão, pois estes metabolitos não se encontram em níveis elevados nestas suspensões (Santos et al., 2016; Twyman et al., 2003).

Em termos de culturas de células vegetais em suspensão, as mais utilizadas são derivadas de *N. tabacum*, especialmente *N. tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2). Esta linha foi estabelecida em 1968 no Centro de Investigação Central da Corporação Pública de Tabaco e Sal do Japão (atual Laboratório de Investigação da Ciência do Tabaco, empresa Japan Tobacco) (Nagata et al., 1992). As células BY-2 têm um crescimento muito rápido, podem multiplicar-se pelo menos 100 vezes no espaço de uma semana pois possuem um tempo de duplicação de 16 a 24 horas quando submetidas a condições ótimas (Santos et al., 2016; Xu et al., 2016). Recentemente, foram efetuadas estratégias de *knock-out* por CRISPR/Cas9 de $\beta(1,2)$ -xilosiltransferase e $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferase para a produção de proteínas recombinantes em células de BY-2 desprovidas de glicanos presentes em plantas (Hanania et al., 2017; Mercx et al., 2017).

5. Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina

Existem dois tipos de enzimas prostaglandinas D sintase que evoluíram a partir de famílias de proteínas filogeneticamente distintas: prostaglandina D sintase do tipo hematopoiético e prostaglandinas D sintase do tipo lipocalina (Filler et al., 2014; Orenes-Piñero et al., 2013; Urade & Eguchi, 2002).

A proteína prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS), também conhecida como β -trace (Filler et al., 2014), é uma glicoproteína monomérica com 168 aminoácidos e com um peso molecular entre 23 a 29 kDa (dependendo do seu grau de N-glicosilação e diferenças na estrutura dos oligossacáridos), com um tempo de semi-vida de aproximadamente 1.2 horas e filtrada através da membrana basal glomerular (Chen, 2011; Filler et al., 2014; Orenes-Piñero et al., 2013). É uma proteína muito abundante no líquido cefalorraquidiano (LCR) e é responsável pela conversão de prostaglandina H₂ (PGH₂; precursor de vários prostanoídes) a prostaglandina D₂ (PGD₂; Figura I.2) (Filler et al., 2014; Meco et al., 2003; Orenes-Piñero et al., 2013; Urade & Hayaishi, 2000).

No sistema nervoso central, a PGD₂ possui funções ao nível da transmissão sináptica, controlo hipotalâmico da temperatura, recuperação de convulsões e indução do sono (Xin et al., 2009). Nos tecidos periféricos, a β -trace atua na regulação da nocicepção, inibição da agregação de plaquetas, vasodilatação, broncoconstrição. Tem um efeito antitrombótico e anti-aterogénico, promovendo um papel cardiovascular protetor e medeia reações inflamatórias e anafiláticas pelo recrutamento de células inflamatórias (Chen, 2011; Filler et al., 2014; Orenes-Piñero et al., 2013; Urade & Hayaishi, 2000). A L-PGDS é uma proteína com dupla função, pois além de produzir PGD₂, sendo uma lipocalina, esta enzima liga-se à biliverdina, bilirrubina (Kanekiyo et al., 2007; Meco et al., 2003; Orenes-Piñero et al., 2013; Taniguchi et al., 2007; Taniike et al., 2002; Urade & Hayaishi, 2000; Xin et al., 2009), ácido retinóico (Meco et al., 2003; Orenes-Piñero et al., 2013; Taniguchi et al., 2007; Taniike et al., 2002; Xin et al., 2009), feromonas sexuais (Xin et al., 2009),

hormonas tiroideias (Orenes-Piñero et al., 2013) e péptidos β -amiloides, funcionando como proteína de transporte para estes compostos e como chaperona endógena de β -amiloides para prevenir a deposição amiloide (Kanekiyo et al., 2007).

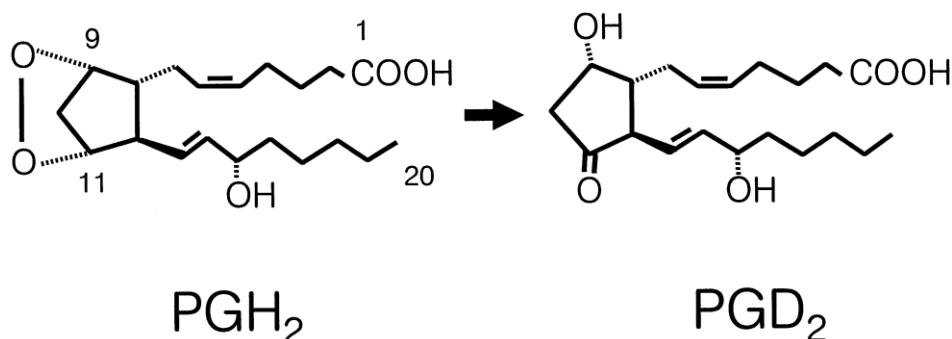


Figura I.2 – Conversão de prostaglandina H_2 a prostaglandina D_2 , catalisada por L-PGDS (adaptado de Urade & Hayaishi, 2000).

A glicoproteína L-PGDS é predominantemente sintetizada no cérebro e secretada nas zonas cerebrais ricas em glia (Grünewald et al., 1999). É também sintetizada em órgãos genitais masculinos de vários mamíferos (Orenes-Piñero et al., 2013; Urade & Hayaishi, 2000), no coração humano (Orenes-Piñero et al., 2013; Urade & Hayaishi, 2000), melanócitos (Orenes-Piñero et al., 2013) e rins (Orenes-Piñero et al., 2013) e é secretada em vários fluidos corporais, como LCR, plasma, plasma seminal e urina (Meco et al., 2003; Orenes-Piñero et al., 2013; Urade & Hayaishi, 2000). É simultaneamente produzida e secretada por mastócitos, basófilos e células TH2 (Urade & Eguchi, 2002).

O potencial de L-PGDS como biomarcador é já reconhecido. É um marcador específico para fugas de LCR, pois representa cerca de 3% das proteínas presentes neste fluido (Filler et al., 2014; Orenes-Piñero et al., 2013). Concentrações anormais de LCR foram também observadas em enfarte cerebral, esclerose múltipla, esquizofrenia, entre outros (Chen, 2011; Grünewald et al., 1999). Esta proteína emergiu recentemente como marcador endógeno da taxa de filtração glomerular (Filler et al., 2014; Orenes-Piñero et al., 2013). A concentração de L-PGDS encontra-se ligeiramente superior em amostras de urina de pacientes no estágio inicial da diabetes apesar do nível de creatinina permanecer normal, o que pode justificar a sua utilização como biomarcador para estádios iniciais desta doença pois é mais sensível que a creatinina, biomarcador utilizado para a diabetes (Urade & Eguchi, 2002). Além disso, a L-PGDS está ainda a emergir como biomarcador para o risco cardiovascular (Orenes-Piñero et al., 2013) e para a hidrocefalia de pressão normal (Mase et al., 2003). Foi reportado que uma redução da β -trace induz a obesidade e facilita a aterosclerose (Pires et al., 2014). Tem ainda um papel protetor contra hipoxemia e encefalopatia hipóxico-isquémica e um papel importante na espermatogénese (Pires et al., 2014; Taniguchi et al., 2007). Foram ainda encontrados níveis elevados de L-PGDS no nervo ótico de

pacientes com hipertensão intracraniana idiopática e em pacientes com glaucoma de tensão normal (Xin et al., 2009). Um dos estudos mais importantes foi a descoberta da β -trace como chaperona de péptidos β -amiloide e do seu papel de prevenção na agregação de placas β -amiloide no cérebro. Quando a β -trace foi removida do LCR, a atividade inibitória contra a agregação de placas β -amiloide diminuiu em 60%, o que sugere que a função desta proteína como chaperona possa estar envolvida no início e na progressão da doença de Alzheimer (Kanekiyo et al., 2007). Num outro estudo, Hansson et al. (2009) demonstraram uma redução de L-PGDS em pacientes com doença de Alzheimer e sugeriram um cenário terapêutico baseado em fármacos que restaurem a capacidade de sequestro de placas β -amiloide em pacientes com doença de Alzheimer.

6. Modificações epigenéticas

A epigenética refere-se a padrões de expressão génica hereditários que não são determinados pela sua sequência de DNA (Bender, 2002). Em termos de regulação da estrutura da cromatina e atividade génica, as modificações pós-tradução nas caudas de histonas (acetilação, metilação, forforilação e ubiquitinação), metilação do DNA e RNA de interferência têm papéis muito importantes, uma vez que estas modificações afetam a transcrição (Wu et al., 2008; Zhang, 2008). As modificações epigenéticas dividem-se assim em quatro tipos: metilação do DNA, modificações pós-tradução das caudas das histonas (em particular, metilação e acetilação), remodelação da cromatina, e *small* RNAs.

Grande parte do RNA não codificante (nc) possui funções que permanecem desconhecidas. No entanto, pensa-se que estes ncRNAs e/ou a transcrição em si são importantes para o estabelecimento e manutenção de modificações epigenéticas em genomas de organismos eucariotas (Matzke et al., 2009). Quando o ncRNA longo é processado são originados pequenos fragmentos de RNA de interferência (siRNA), responsáveis por conduzir modificações da cromatina para regiões homólogas do genoma. Estas modificações induzem metilação *de novo* das citosinas (Matzke et al., 2009). Foram identificadas quatro classes de RNA de interferência: microRNA, *transacting* siRNA, *natural-antisense* siRNA e siRNA (Zhang, 2008).

A metilação do DNA é caracterizada pela conversão de resíduos de citosina presentes no DNA em 5-metilcitosina através da adição de um grupo metilo (Razin & Riggs, 1980; Sahu et al., 2013). A metilação do DNA em plantas é essencial no silenciamento de transposões e na regulação do desenvolvimento. A perda de metilação resulta na reativação de transposões (Zhang, 2008). Alguns estudos demonstraram que plantas que crescem em condições de *stress* transmitem os seus padrões de metilação de DNA à descendência, revelando uma adaptação ao *stress* a curto e a longo prazo, sendo observado o mesmo padrão de metilação em plantas não expostas a qualquer tipo de *stress* (Sahu et al., 2013). A metilação é também importante para a saúde humana. Uma

das áreas de investigação relevantes neste âmbito é a relação entre a metilação do DNA e o cancro. A hipermetilação nas regiões dos promotores leva à inativação de certos genes supressores de tumores e já foi demonstrado que em vários tipos de cancro existem diversos genes silenciados pela metilação do DNA (Kulis & Esteller, 2010). A hipometilação também contribui para a transformação celular pois induz instabilidade genómica. Assim, a metilação do DNA pode ser investigada para aplicações terapêuticas, uma vez que a metilação (ao contrário de alterações genéticas) é um processo reversível (Kulis & Esteller, 2010). Um dos exemplos de um inibidor da metilação de DNA utilizado para o tratamento de cancro é a 5-azacitidina. A hipometilação do DNA também é conseguida devido à inibição de DNA metiltransferases (Christman, 2002). Em Maio de 2004, foi aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* o uso de 5-azacitidina (com o nome comercial VidazaTM) para o tratamento de síndromes mielodisplásicas (Kaminskas et al., 2005). Em células de mieloma, o tratamento com 5-azacitidina demonstrou efeitos de citotoxicidade em células de mieloma mas não em células provenientes da medula óssea ou em células mononucleares sanguíneas periféricas (Kiziltepe et al., 2007).

O nucleossoma é a estrutura básica da cromatina. Contém aproximadamente 146 pares de bases de DNA envoltos num octâmero de histonas que contêm duas moléculas de cada histona, nomeadamente H2A, H2B, H3 e H4 (Liu et al., 2016; Rice & Allis, 2001). Em 1964, Vincent Allfrey e os seus colegas propuseram um envolvimento da acetilação de histonas na regulação da transcrição (Allfrey et al., 1964). A acetilação e desacetilação reversível das histonas no N-terminal das suas caudas desempenham um papel importante na regulação da atividade génica (Liu et al., 2016). Enquanto a hiperacetilação das histonas relaxa a estrutura da cromatina e está associada à ativação da transcrição, pois facilita a ligação de fatores de transcrição à região de promotores, a hipoacetilação induz a compactação da cromatina e repressão génica devido ao bloqueio da acessibilidade da ligação de fatores de transcrição a genes alvo (Liu et al., 2016; Ma et al., 2013). Os níveis de acetilação e desacetilação das histonas são determinados pela ação de histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs), respetivamente. Existem 3 classes de HDACs em plantas: RPD3/HDA1 (engloba as HDACs HDA19, HDA6, HDA7 e HDA9), SIR2 e HD2 (Ma et al., 2013; Nevalainen & Peterson, 2014; Wu et al., 2008).

A acetilação envolve a transferência de um grupo acetil derivado de acetil-coA para o grupo ε-amina de um resíduo de lisina na cauda N-terminal das histonas por ação das HATs. As HDACs removem os grupos acetil das histonas. A adição de grupos acetil a uma cadeia lateral de uma lisina modifica a estrutura da cromatina e regula a transcrição, replicação e reparação do DNA. Inicialmente, foi sugerido que a acetilação das histonas neutralizava as cargas positivas dos resíduos de lisina e reduzia as interações eletrostáticas entre as histonas e os grupos fosfato do DNA, tornando-o mais acessível a fatores de transcrição (Ma et al., 2013). No entanto, há cada vez mais provas que indicam que a acetilação diminui as interações entre nucleossomas vizinhos e previne a compactação dos nucleossomas em fibras de cromatina de 30 nm, o que leva a uma

estrutura mais solta da cromatina (Ma et al., 2013). Além de modificar a estrutura da cromatina, a acetilação altera ainda a superfície dos nucleossomas e “molda” a superfície de ligação destinada às proteínas envolvidas na transcrição (Ma et al., 2013). Os alvos de acetilação/desacetilação em plantas são o N-terminal de resíduos de lisina nas histonas H3 (K9, K14, K18, K23 e K27) e H4 (K5, K8, K12, K16 e K20) (Liu et al., 2016; Ma et al., 2013). O primeiro fármaco aprovado como inibidor de HDACs para o tratamento de linfoma cutâneo (Verdin & Ott, 2014) é denominado de Vorinostat (também conhecido como ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA)).

6.1. Histona desacetilase 6

A histona desacetilase 6 (HDA6) é uma HDAC que possui a capacidade de remover grupos acetil de vários resíduos de lisina em diversas histonas (Earley et al., 2006). Os substratos de HDA6 são lisinas localizadas nas histonas H3 e H4, histonas cujos processos de acetilação/desacetilação estão associados a ativação/inativação gênica (Earley et al., 2006). É uma histona com um papel fundamental em mecanismos epigenéticos que silenciam genes de RNA ribossomal e afeta ainda a expressão de transgenes (Earley et al., 2006; Murfett et al., 2001).

O sítio ativo de histonas desacetilase da classe RPD3/HDA1 consiste numa bolsa que contém na sua extremidade um íon de zinco (Zn^{2+}). Este íon e diversos resíduos adjacentes conservados (incluindo 2 resíduos adjacentes de histidina, 2 resíduos de aspartato e 1 resíduo de tirosina) são essenciais para a catálise da remoção de um grupo acetil (Ma et al., 2013).

A histona desacetilase 6 (HDA6) é a única HDAC que coopera com siRNAs para a repressão gênica (Kim et al., 2012). Inicialmente, a HDA6 foi identificada como repressor genético de expressão transgênica (Kim et al., 2012). Mais recentemente, foram identificadas diversas funções da HDA6, como silenciamento gênico de regiões heterocromáticas e regulação da atividade gênica em resposta a sinais ambientais e de desenvolvimento, como repressão de genes embrionários específicos após germinação e hipersensibilidade ao ácido abscísico (Chen et al., 2010; Ma et al., 2013; Tanaka et al., 2007). Além disso, a HDA6 é necessária para a resposta do ácido jasmônico, senescência e floração (Wu et al., 2008). As mutações em *HDA6* resultam em transições de heterocromatina para eucromatina, levantamento da repressão de genes ribossomais, descondensação nas regiões NOR e substituição da metilação da lisina 9 na histona H3 (H3K9) por trimetilação da H3K4, acetilação da H3K9, acetilação da H3K14 e tetra-acetilação da histona H4 (Earley et al., 2006; Kim et al., 2012; Ma et al., 2013; Shan et al., 2013). Além disso, o gene *HDA6* interage diretamente com a metiltransferase 1 para silenciar transposições através da modelação de acetilação e metilação de histonas e metilação de DNA (Liu et al., 2012; Ma et al., 2013; To et al., 2011).

7. Técnicas de edição de genoma

O aparecimento de tecnologias de edição de genoma permitiu um grande avanço na investigação, pois permite introduzir modificações específicas na sequência de DNA em diversos tipos de células e organismos (Gaj et al., 2016).

A edição de genoma a partir da utilização de nucleases que atuam em locais específicos permite efetuar experiências ao nível da manipulação do genoma e da integração de transgenes (Bortesi & Fischer, 2015). Esta edição envolve a introdução de quebras na cadeia dupla (DSBs) de DNA utilizando uma nuclease, o que vai ativar mecanismos de reparação do DNA (Bortesi & Fischer, 2015; Gaj et al., 2013). Podem conseguir-se modificações de genoma diferentes dependendo da via de reparação e do fornecimento de um *template* de reparação. Existem duas vias de reparação de DSBs: junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e recombinação homóloga (RH) (Bortesi & Fischer, 2015; Gaj et al., 2013). Apesar da indução da recombinação em loci específicos após a criação de DSBs, a reparação por NHEJ é o mecanismo de reparação mais comum na maioria dos organismos (Bortesi & Fischer, 2015). Geralmente, a NHEJ causa inserções ou deleções aleatórias, resultando em mutações *frameshift* (quando ocorrem na região codificante de um gene) e criando assim um *knockout* génico (Bortesi & Fischer, 2015). Quando é fornecido um *template* de DNA com regiões homólogas à sequência flanqueada pela DSB, as quebras podem ser reparadas por RH. Este tipo de reparação pode ser explorado para a obtenção de inserção de genes ou modificações génicas precisas (Bortesi & Fischer, 2015).

Em termos de nucleases que atuam em locais específicos para uma edição de genoma eficiente, existem até agora 4 classes de proteínas de ligação ao DNA que foram manipuladas: meganucleases derivadas de elementos genéticos móveis microbianos (Smith et al., 2006), nucleases *zinc finger* (ZFNs) baseadas em fatores de transcrição de organismos eucariotas (Kim et al., 1996), nucleases efectoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) (Boch et al., 2009) e, mais recentemente, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated protein-9 nuclease* (CRISPR-Cas9) (Jinek et al., 2012). As meganucleases não são muito utilizadas como plataforma para a manipulação do genoma devido à falta de correspondência entre os resíduos presentes nos aminoácidos da meganuclease e a sequência alvo de DNA, algo que não se verifica nas restantes classes de nucleases (Hsu et al., 2014). ZFNs e TALENs são enzimas artificiais que consistem num domínio modular de ligação de DNA e um domínio que consiste numa nuclease FokI. Em ambos os casos, o domínio de ligação do DNA pode ser manipulado para reconhecer uma sequência específica de DNA. Contudo, o *design*, síntese e validação destas proteínas é dispendiosa e morosa. No caso de ZFNs existe uma grande taxa de insucesso em reconhecer e cortar a sequência desejada de DNA (Belhaj et al., 2015; Bortesi & Fischer, 2015; Hsu et al., 2014). O sistema CRISPR-Cas9 tem a capacidade de reconhecer sequências específicas no DNA. Como tal, este sistema tem sido explorado como uma

plataforma de edição de genoma guiada por RNA, uma vez que é mais versátil do que ZFNs e TALENs (Bortesi et al., 2016).

7.1. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated protein-9 nuclease (CRISPR-Cas9)*

O sistema CRISPR foi primeiramente identificado em *E. coli* em 1987 e foi desenvolvido com o objetivo de editar o genoma de forma rápida e eficiente (Jinek et al., 2012). Este sistema oferece diversas vantagens quando comparado com ZFNs ou TALENs, como a facilidade de customização, maior eficiência e capacidade para facilitar a edição de genoma *multiplex*. No entanto, apesar da sua especificidade, este sistema pode produzir mutações *off-target* ao longo do genoma (Bortesi & Fischer, 2015; Ran et al., 2013).

Na natureza, o CRISPR-Cas faz parte do sistema imunitário microbiano que utiliza nucleases guiadas por uma sequência de RNA para a clivagem de elementos genéticos estranhos. Foram identificados 3 tipos de sistemas CRISPR, em que cada sistema contém um conjunto de genes associados ao CRISPR (Cas), RNAs não codificantes e diversos elementos repetitivos. Estas repetições estão espaçadas por pequenas sequências variáveis derivadas de DNA exógeno designadas por *protospacers*. Este conjunto é denominado de CRISPR RNA (crRNA). Cada *protospacer* está associado a um motivo adjacente (*Protospacer adjacent motif*, PAM) que varia de acordo com o tipo de CRISPR específico. O sistema CRISPR tipo II é o que está mais caracterizado e por isso é o mais utilizado. O tipo II contém uma nuclease Cas9 (contém dois domínios catalíticos de clivagem, HNH e RuvC), o crRNA (contém os RNAs guia) e um *transactivating crRNA* (tracrRNA) que facilita o processamento de crRNA em pequenas unidades. Cada unidade contém uma sequência guia de 20 pares de base (pb) que vai direcionar a Cas9 para um alvo de DNA de 20 pb através de emparelhamento Watson-Crick. Na extremidade 3' da sequência alvo encontra-se o PAM, essencial ao reconhecimento e clivagem do sítio alvo pela Cas9. No interior de uma bactéria, quando vetores e organismos estranhos a invadem, o crRNA e tracrRNA transcritos após encontros subsequentes com o mesmo organismo, formam um complexo que guia a nuclease Cas9 para o reconhecimento e clivagem do DNA pertencente ao organismo invasor. No sistema CRISPR-Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes*, o DNA alvo tem que se encontrar imediatamente antes de um PAM com a sequência NGG (em que N pode ser A, T, C ou G) (Bortesi et al., 2016; Bortesi & Fischer, 2015; Gao et al., 2015; Ran et al., 2013).

A transição do sistema CRISPR-Cas da natureza para a manipulação genética ocorreu quando se demonstrou que a sequência de DNA alvo podia ser programada apenas pela mudança de 20 nucleótidos no crRNA, combinando esta especificidade com as propriedades estruturais ou tracrRNA num único RNA guia (gRNA) através de um *linker* (Figura I.3). Posteriormente, foi demonstrado que se podem utilizar diversos gRNAs com sequências diferentes para a engenharia genómica *multiplex* em diferentes *loci* em simultâneo (Bortesi & Fischer, 2015).

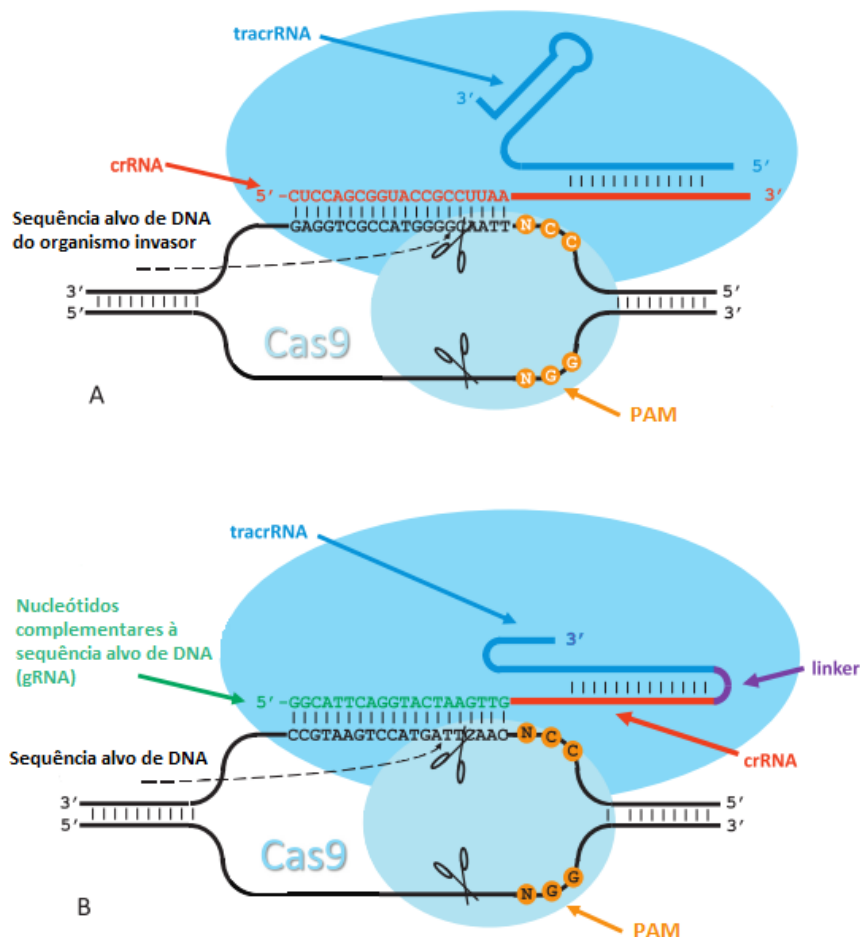


Figura I.3 – Estrutura de CRISPR-Cas9. A – CRISPR-Cas9 natural, direcionado por um gRNA obtido por duas moléculas de RNA parcialmente emparelhadas; B – CRISPR-Cas9 manipulado, direcionado por um único gRNA obtido pela fusão de crRNA e tracrRNA através de um *linker* (adaptado de Quétier, 2015).

8. Objetivos do projecto

Apesar do desenvolvimento e das vantagens associadas ao *Molecular Farming*, mais concretamente em relação à utilização de culturas de células vegetais em suspensão para a produção de proteínas recombinantes, é necessário aumentar a quantidade de proteína recombinante obtida para ser possível competir com os rendimentos obtidos nos sistemas tradicionais. Previamente, o nosso laboratório transformou culturas em suspensão de *N. tabacum* BY-2 para produção de L-PGDS humana recombinante. Este projeto tem como objetivo aumentar

a quantidade de L-PGDS recombinante produzida nestas linhas celulares através do *knock-out* de um gene envolvido em silenciamento de transgenes e na acetilação de histonas. Para tal, pretende-se efetuar uma mutação direcionada ao gene *HDA6* utilizando a técnica CRISPR-Cas9. Este gene codifica uma histona desacetilase envolvida na desacetilação de histonas e subsequente repressão génica. Assim, espera-se que a mutação leve a uma inativação do gene, resultando num aumento na acetilação de histonas e subsequente aumento de transcrição, conduzindo a um aumento da quantidade de L-PGDS secretada para o meio de cultura.



II. Materiais e Métodos

1. Material Vegetal

Foram previamente obtidas culturas de células em suspensão de *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2 (BY-2) expressando de forma estável L-PGDS recombinante obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo pTRA-BT-AH (Figura II.1). Estas culturas encontravam-se já disponíveis no laboratório de Biologia Celular de Plantas do ITQB NOVA.

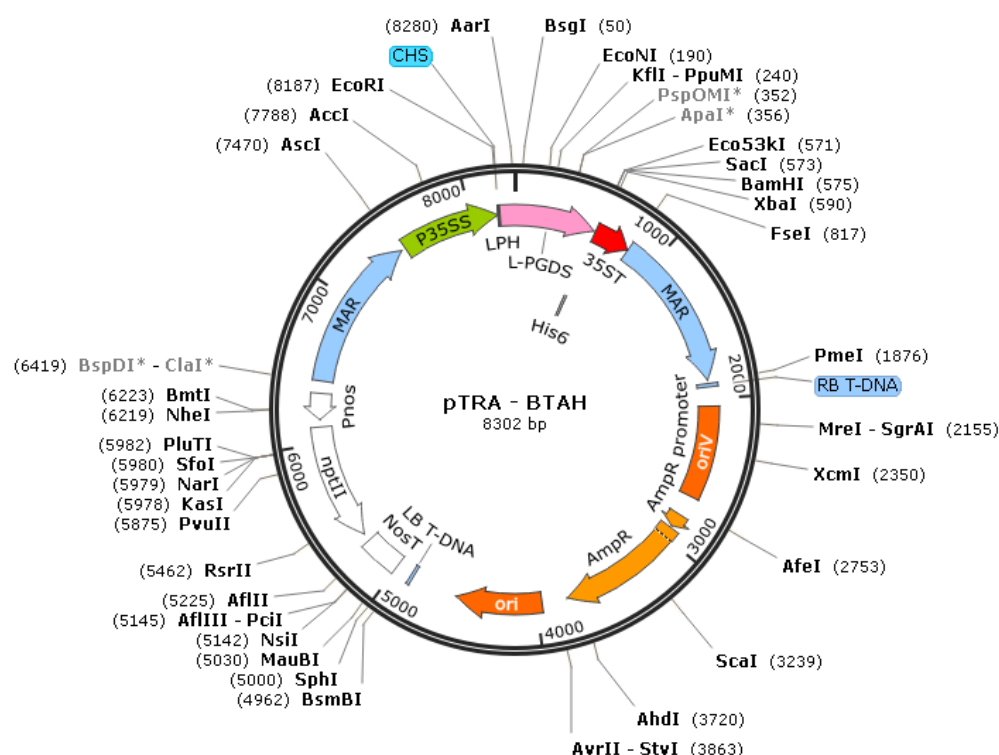


Figura II.1 – Plasmídeo pTRA-BT-AH.

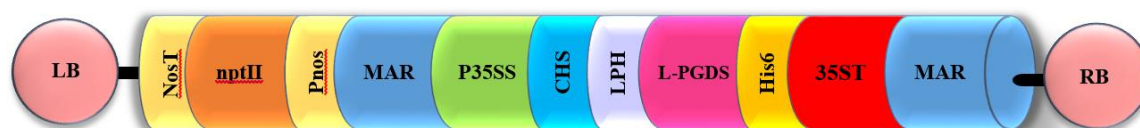


Figura II.2 – T-DNA presente no plasmídeo pTRA-BT-AH.

A região de DNA de transferência (T-DNA) inserida no plasmídeo, delimitada pelas *left border* e *right border* (LB e RB), contém o DNA complementar (cDNA) que codifica a proteína L-PGDS (NCBI BC005939; Figura II.2). O cDNA encontra-se sob o controlo do promotor constitutivo 35SS (P35SS), uma versão melhorada do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. A montante do cDNA uma região não traduzida (CHS) que estabiliza o RNA mensageiro; encontra-

se ainda um péptido sinal de murino (LPH), otimizado para plantas, que guia a proteína até à via secretora. A jusante do gene L-PGDS situa-se um *tag* de fusão no C-terminal que contém seis resíduos de histidina (His6) para purificação da proteína e uma sequência terminadora (35ST). A flanquear o cDNA estão regiões MAR (*Matrix Attachment Regions*) que previnem fenómenos de silenciamento génico e estabilizam a expressão do transgene (Abranches et al., 2005). Imediatamente após a LB, encontra-se uma cassette de resistência à canamicina composta pelo gene *nptII*, pelo promotor de nopalina sintase *Pnos* e pelo terminador de nopalina sintase *NosT*. O vetor foi construído com base no plasmídeo pTRA criado por Thomas Rademacher (Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Aachen, Alemanha).

1.1. Manutenção de culturas de células vegetais em suspensão BY-2

Para a subcultura foram adicionados cerca de 25 mL de meio de cultura Murashige & Skoog (MS; ver anexo 1.4) suplementado com canamicina (100 mg/L; Duchefa Biochemie, Holanda) e 4% de cultura BY-2 transformada expressando L-PGDS (denominada de linha BT) num balão de Erlenmeyer. A cultura foi mantida a temperatura constante de 28°C num agitador orbital a 120 rpm (Gerhardt, Laboshake) no escuro. A repicagem foi realizada de 10 em 10 dias.

2. Caracterização da curva de crescimento da linha BT

O ensaio de caracterização da curva de crescimento da linha BT foi realizado ao longo de 14 dias, utilizando quatro replicados biológicos. Os pesos secos das culturas foram medidos ao longo da curva de crescimento.

2.1. Preparação do inóculo inicial de cultura BT para o estudo da curva de crescimento

Para a preparação do inóculo inicial, foi adicionado ao meio de cultura MS suplementado com canamicina (100 mg/L) 5% de inóculo contendo células BY-2 expressando L-PGDS (linha BT) com um crescimento de 10 dias.

2.2. Filtração a vácuo das culturas celulares

A separação do meio de cultura e das células foi conseguida através de uma filtração a vácuo. Colocou-se no interior de um Kitasato um tubo de 50 mL para recolha do meio de cultura e, em seguida, foi necessário instalar um funil de Büchner no topo do Kitasato e aplicar papel de filtro previamente pesado (110 mm; VWR, EUA). Inseriu-se uma mangueira na abertura lateral do Kitasato e ligou-se a uma bomba de vácuo. A cultura de células vegetais foi filtrada e, em seguida,

o papel de filtro que contém as células foi colocado numa estufa a 60°C durante 48 a 72 horas. O meio de cultura foi armazenado a -20°C. Após o período de incubação necessário, procedeu-se à pesagem das células.

3. Análise da expressão da proteína L-PGDS em culturas de BY-2 BT

3.1. Quantificação da proteína total utilizando o método de Bradford

Foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976) para a determinação da quantidade de proteína total presente no meio de cultura obtido por filtração a vácuo. O ensaio foi executado de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, EUA).

Efetuar-se-iam duas curvas padrão diferentes em placas de 96 poços:

- Dia 0 a 4: a gama linear de valores é de 8.0 µg/ml a aproximadamente 80 µg/ml;
- Dia 7 a 14: a gama linear de valores é de 50 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml.

Relativamente à curva padrão dos dias 0 a 4, foram pipetados 160 µL de reagente de Bradford (Bio-Rad, EUA) e 40 µL de amostra. Foram efetuados 3 replicados técnicos de cada amostra. A amostra foi homogeneizada com o reagente e a placa permaneceu a incubar durante cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 595 nm no NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA) utilizando o *software* NanoDrop 2000/2000c (versão 1.4.1).

A partir dos valores obtidos de dia 7 a 14 houve necessidade de repetir o ensaio com uma curva padrão com valores superiores aos utilizados anteriormente. Para tal, o reagente de Bradford foi diluído para uma razão de 1:4 (reagente:água bidestilada). Em seguida, foram pipetados 200 µL de reagente de Bradford e 10 µL de amostra. Foram efetuados 3 replicados técnicos de cada amostra. A amostra foi homogeneizada com o reagente e a placa permaneceu a incubar durante cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 595 nm no espectrofotómetro Epoch Microplate (BioTek Instruments, EUA).

3.2. Preparação das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O meio de cultura obtido por filtração a vácuo foi precipitado em 4 volumes de etanol absoluto (Carlo Erba, Itália) e incubado a -20°C *overnight*. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 10000g durante 10 minutos (Eppendorf, Centrifuge 5415 D) e o sobrenadante descartado. Após o etanol secar totalmente, o *pellet* foi concentrado 5 vezes com tampão de amostra 1x (ver anexo 1.1) e homogeneizado. Em seguida, ferveu-se a amostra durante 10 minutos e foi realizado um *spin-down* antes de cada amostra ser carregada no gel SDS-PAGE.

3.3. Preparação de SDS-PAGE 12.5%

Os géis foram preparados num suporte Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Module (Figura II.3A; Bio-Rad, EUA). Foi preparado o gel de resolução conforme indicado na Tabela II.1 e aplicado entre as placas de vidro. Em seguida, foi aplicada uma fina camada de isopropanol para eliminar as bolhas de ar no topo do gel resultantes do carregamento do gel. O gel permaneceu a polimerizar durante cerca de 1 hora e no final retirou-se o excesso de isopropanol com papel de filtro. Após a remoção do isopropanol procedeu-se à preparação do gel de concentração (Tabela II.1) que foi aplicado sobre o gel de resolução já polimerizado, colocando-se de imediato os pentes para criar os poços no gel onde se irão carregar as amostras. Os géis estiveram a polimerizar durante cerca de 1 hora.

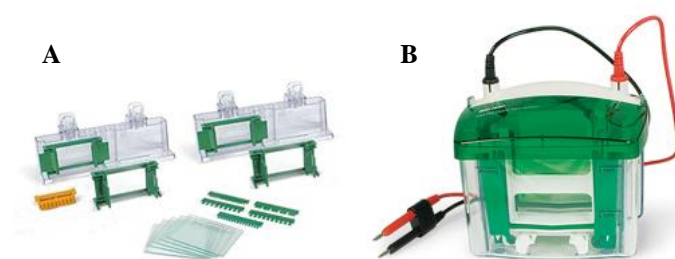


Figura II.1 – Aparelho de montagem de géis Mini-PROTEAN Tetra Cell (A) e tina Mini-PROTEAN Tetra Cell (B) (Bio-Rad, EUA).

Tabela II.1 – Preparação dos géis de concentração e resolução SDS-PAGE 12.5% (volumes para 2 géis).

Solução stock	Gel de concentração (mL)	Gel de resolução (12.5% acrilamida) (mL)
Água	2.82	3.98
Stock de tampão para gel de concentração (ver anexo 1.1)	1.25	
Stock de tampão para gel de resolução (ver anexo 1.1)		1.25
10% SDS (NZYtech, Portugal)	0.05	0.1
Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) (NZYTech, Portugal)	0.625	4.2
TEMED (Sigma-Aldrich, EUA)	0.005	0.005
1,5% Persulfato de amónio (Merck, EUA)	0.25	0.5

Os géis foram colocados numa tina Mini-PROTEAN Tetra Cell (figura II.3B; Bio-Rad, EUA) e o tanque foi preenchido com tampão de corrida 1x (ver anexo 1.1) até os elétrodos estarem totalmente cobertos. Os pentes foram retirados e as amostras foram colocadas com uma microseringa de 50 μ L (Hamilton, Suíça), assim como o marcador NZYColour Protein Marker II (NZYTech, Portugal). Pipetaram-se 5 μ L de marcador NZYColour Protein Marker II e 20 μ L de cada amostra. Foi aplicada uma intensidade de corrente de 30mA (15mA/gel) e uma tensão elétrica constante de 180V durante cerca de 2 horas. Após a corrida, um dos géis foi corado com BlueSafe (NZYTech, Portugal) *overnight* num agitador oscilante Duomax 1030 (Heidolph, Alemanha) com agitação ligeira e, no dia seguinte, o gel foi lavado sucessivamente com água desmineralizada com o propósito de retirar o excesso do corante. O gel remanescente foi utilizado para transferência de proteínas.

3.4. Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose

Para a deteção de L-PGDS, a transferência foi efetuada utilizando o método de transferência semi-seca. Para tal, foi necessária uma imersão prévia de papel de filtro 3MM (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido), membrana de nitrocelulose com 0.2 μ m de poro (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) e do gel obtido por SDS-PAGE 12.5% em tampão de transferência de proteínas (ver anexo 1.2). Em seguida, colocaram-se 3 folhas de papel de filtro 3MM no aparelho de transferência Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, EUA), adicionou-se a membrana de nitrocelulose e acrescentou-se o gel. Após remoção das bolhas entre a membrana e o gel, juntaram-se por cima mais 3 folhas de papel de filtro 3MM. Colocou-se a tampa com os elétrodos e aplicou-se uma intensidade de corrente constante de 400mA e uma tensão elétrica constante de 18V durante 25 minutos.

3.5. Imunodeteção de L-PGDS

Após a transferência de proteínas do gel SDS-PAGE 12.5% para a membrana de nitrocelulose, a membrana foi colocada numa solução de bloqueio (ver anexo 1.2) durante uma hora num agitador oscilante com agitação ligeira à temperatura ambiente. Seguidamente foram efetuadas lavagens da membrana com PBS-T (ver anexo 1.2) durante 5 minutos. A operação foi repetida 3 vezes. O anticorpo primário anti-L-PGDS (ab61866; Abcam, Reino Unido) foi diluído para uma razão de 1:500 em PBS-T e a membrana foi incubada com o anticorpo primário durante cerca de 1 hora à temperatura ambiente, seguida de incubação a 4°C *overnight*, num agitador oscilante com agitação ligeira. No dia seguinte, foram efetuadas lavagens da membrana com PBS-T durante 5 minutos. A operação foi repetida 3 vezes. O anticorpo secundário anti-Rabbit conjugado com fosfatase alcalina (A3687; Sigma-Aldrich, EUA) foi diluído para uma razão de 1:4000 em PBS-

T e a membrana foi incubada com o anticorpo secundário durante cerca de 2 horas num agitador oscilante com agitação à temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada com PBS-T durante 5 minutos e a operação foi repetida 3 vezes. Finalmente, foi colocada uma solução de detecção NBT/BCIP (ver anexo 1.2) sobre a membrana de nitrocelulose. A solução foi espalhada sobre a membrana de nitrocelulose e a membrana foi coberta com uma tampa escura até ao aparecimento de bandas (cerca de 5 minutos). Quando foi possível visualizar bandas nítidas, a membrana foi lavada com água desmineralizada para parar a reação.

4. Sequenciação de *HDA6*

Com o objetivo de aumentar a quantidade de L-PGDS em *N. tabacum* BY-2 através do silenciamento do gene *HDA6*, foi necessário sequenciar o primeiro exão de *HDA6*, uma vez que a sequência não era totalmente conhecida à data (*predicted sequence* NCBI XM_016658646.1).

4.1. Extração de DNA genómico de *N. tabacum* BY-2

Foram filtradas a vácuo culturas de células vegetais em suspensão transformadas com L-PGDS com 7 dias. As células obtidas foram maceradas num almofariz, utilizando azoto líquido para facilitar a maceração. O conteúdo obtido foi colocado num microtubo de 1.5 mL e adicionou-se 700 µL de tampão de extração (ver anexo 1.3). O microtubo foi centrifugado a 15700g durante 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de uma solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1; Sigma-Aldrich, EUA). O microtubo foi invertido gentilmente 3 vezes e novamente centrifugado a 15700g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionou-se o mesmo volume de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1; Sigma-Aldrich, EUA). O microtubo foi invertido gentilmente 3 vezes e novamente centrifugado a 15700g durante 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo e adicionou-se o dobro do volume de etanol 100% a 4°C para precipitar o DNA. O microtubo foi armazenado a -20°C *overnight*. No dia seguinte, o microtubo foi centrifugado a 15700g durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500 µL de etanol 70% (v/v) ao *pellet* e o microtubo foi novamente centrifugado a 15700g durante 5 minutos. O etanol foi descartado e após a secagem total do *pellet* adicionou-se 50 µL de tampão Tris-EDTA (ver anexo 1.3). A quantificação de DNA foi efetuada no NanoDrop 2000c utilizando o software NanoDrop 2000/2000c.

4.2. Sequenciação do primeiro exão de *HDA6*

Foram criados *primers* específicos para sequenciação do primeiro exão de *HDA6* a partir da sequência de *N. tabacum* (https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_tabacum/genome), para

confirmação da presença da sequência nas culturas BY-2 disponíveis em laboratório. Em seguida, o DNA genómico obtido a partir de BY-2 foi amplificado com os *primers* sintetizados por NZYTech, Portugal (Tabela II.2) por PCR (Tabelas II.3 e II.4) para verificar o tamanho do fragmento obtido. Cada reação de PCR foi preparada para um volume final de 10µL. Posteriormente, o DNA foi sequenciado por StabVida, Portugal.

Tabela II.2 – *Primers* utilizados para sequenciação de *HDA6*.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' – 3')
<i>HDA6 Forward</i>	TGGACTCAATAGACTGCGAGG
<i>HDA6 Reverse</i>	GAGGAGCTCAAGAATACCGAG

Sequência de *HDA6* (5' – 3')

Sequência de *primers* representada a negrito e sublinhado.

AGACAGACTTTTTCTCGTGTCTTCTCTTTCCCTATATCTCC**TGGACTCAATAGACTGCG**
AGGAGTTTCATAGAAATCAAAGAGGACAACCTAAACCCAACCTTCATCATCACTCTCAGTCCG
 AGCCAAAAGTAGTGGCCCATGGACTCTTCCACCGTTGACGGCAGCGCGTCGCTTCCATCCA
 CCGGAACCGACGCGAAGAAGCGCCGTGTCTCATACTTCTACGAGCCCACAATCGGCGACTAT
 TACTACGGGCAAGGTCACCCAATGAAGCCTCACCGTATACGTATGGCCCACAATCTCATCGT
 GCACTACTACCTACACCGTCGTATGGAATCAGTCGCCCTTTTCCGGCGGGTCCCGATGACA
 TTCGCCGGTTCCACTCGCCGGACTACGTCGACTTCTTTCTCCGTTTCGCCGGAGACTCTTC
 ATGACCATACCACGCGCGTCATCTCAAACGCTTCAATGTTGGTGAGGACTGCCCTGTTTTTG
 ATGGGCTTTTCGGGTTTTGTGTCAGGCTTCTGCTGGTGGATCTATTGGTGCTGCTGTTAAGCTTA
 ATAGGCAAGACGCTGATATACTATCAACTGGGCCGGTGGGCTCCACCATGCAAAAAAAG
 TGAAGCTTCTGGATTTTGCTATGTCAATGATATTGTT**CTCGGTATTCTTGAGCTCCTC**AAAA
 TCCATAGGCGTGTATTGTATATAGACATTGATATTCACCATGGTGATGGTGTGAGGAGGCT
 TTTTTCACAACGATAGAGTCATGACAGTGTCTTTCCATAAGTTTGGGGACTTCTTTCCCGT
 ACAGGGCATATCAAAGATATTGGTGCAGGTCAAGGGAAATACTATGCCCTAAATGTTCCGTT
 GAATGATGGGATGGACGACGATAGTTTTGGTCTGCTATTTTCGTCCCGTAATTCAAAAAGTCA
 TGGAGGTCTATCAGCCTGATGCTGTCTTCTTCAATGTGGGGCTGATTCACTGGCTGGAGAC
 AGGTTGGGTGCTTCAATTTGTCTGTCAAGGGCCATGCAGACTGTCTTAGATTCTCAGATCT
 TTCAATGTCCCTCTAATGGTATTGGGTGGTGGAGGTTATACCATAAGAAATGTTGCGAGGTG
 CTGGTGCTATGAGACAGCAGTTGCAGTTGGGGTAGAACCCGGAATAAATTGCCTTACAATG
 AATATTTTGAGTATTTTGGCCAGATTATACTCTTCATGTTGAACCAAAACCCCATGGAGAATA
 AGAATTCACCCAGGGATCTGGAGAAGATCAGGAACATATTGCTTGAGCAACTCTCACAATTA
 CCTCATGCACCTAGTGTGCCATTTCAAACCACTCCTTCTACAACAGAAGTTCCAGAGGAGGA
 AGAGGAAGATATGGATCAAAGACCAAAACCACGTATATGGAATGGAGAGGATTATGGGTCT
 GACGCTGATGAAGATGAGCATCCTAGACAACGAAGTTCAGATAGTAATCTTACTCCAGTCGA
 AACAACAACCTGACATGAGGGATGTGACGACCAAGCCAAAGTAGATGACGACATGGTTGAT
 GCTGATCACTAGTTCAAAGCTATCTTCTACATCTTGCCAAGTGCAGTAACTGATAATTGGTT
 CTGGGTTGAAATTACAAGCCATGAGCTTTGGACCTTCCCCTCTACTTATCAATTGTTCCCTCAG
 TTTCTGTGCTAAAAGAAGTAGAAATAGGAGCTGTTATACATGGGAAAGTTGCACTTGAATG
 TGGGAATGGAGTATTCTAGCTGAGCTCAAGTTTTGTGTTTGCAGATTAACTGTGTAGATTGTA
 GTCCGTTGGTTTTAGATTACAGATTTATGAGTTACAATGCGAAAAGTGGGAGCCGGATGCTA
 TCCCTTGGAACGGAGAGTTGCATCAGAAAAGTAAACAGTGTCTTTCTTCTTACTGATATC
 CGTGCTGATAAGATACAATTATCTGTTGTCTGTGAGGGTTATCCACGTAGTACTGTGGATTAT
 CCATGTAATTTTCAGACAATGATAATTCAACTTCTTATGTAGAAAACAAGATTATGTTAAAT
 AGAGGGTGGTGATCATTGATCAGTC

Tabela II.3 – *Master mix* para PCR. Os *primers* utilizados flanqueiam o primeiro exão de *HDA6*.

	Concentração final
Tampão de reação	1x
MgCl₂	2 mM
DNA genómico	50 ng/μL
Primer Forward	0.5 μM
Primer Reverse	0.5 μM
dNTPs (NZYTech, Portugal)	0.2 mM
NZYTaq	0.024 U/μL

Tabela II.4 – Programa de PCR utilizado no termociclador.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Emparelhamento	52°C	30 segundos	35
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1
Hold	4°C	Indefinido	1

5. Obtenção de gRNA1 e gRNA2 e inserção em pFGC-pcoCas9

Para a construção e entrega de RNA guia (gRNA) em células de BY-2 foram escolhidos 2 plasmídeos: pUC119-gRNA e pFGC-pcoCas9. O plasmídeo pUC119-gRNA foi selecionado para a construção de *guide* RNAs. O plasmídeo pFGC-pcoCas9 é essencial para o protocolo de CRISPR-Cas, uma vez que contém uma endonuclease Cas9 otimizada para plantas. Os dois plasmídeos foram adquiridos no repositório de plasmídeos Addgene (www.addgene.org) onde tinham sido depositados por Jen Sheen (Addgene #52255 e #52256, respetivamente).

O plasmídeo pUC119-gRNA (Figura II.4) é composto por um promotor U6 de *Arabidopsis*, seguido de uma sequência alvo para o gene fitoeno desaturase 3 de *A. thaliana*, de um gRNA *scaffold* (importante para a funcionalidade do gRNA) e de um terminador U6. A marca de resistência para crescimento em bactéria é ampicilina (Li et al., 2015).

O plasmídeo pFGC-pcoCas9 (Figura II.5) é constituído por um local de clonagem múltipla (MCS) onde são inseridos os gRNAs e contém ainda uma endonuclease Cas9 otimizada para

plantas, obtida a partir de *Streptococcus pyogenes* (pcoCas9) com um intrão IV-2. Este intrão pode minimizar os efeitos secundários que podem decorrer da expressão de *pcoCas9* e subsequente extravasamento no crescimento de *E. coli* durante a clonagem. A marca de resistência para crescimento em bactéria é canamicina e para o crescimento em plantas utiliza-se o glufosinato de amónio (Li et al., 2015).

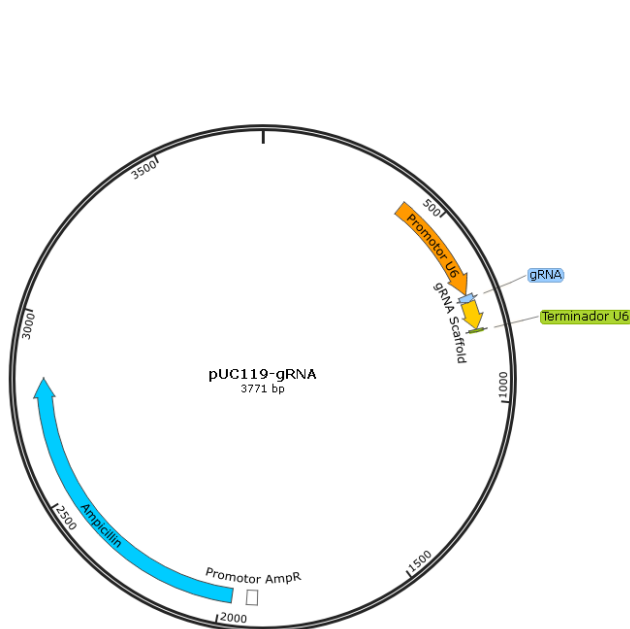


Figura II.2 – Plasmídeo pUC119-gRNA.

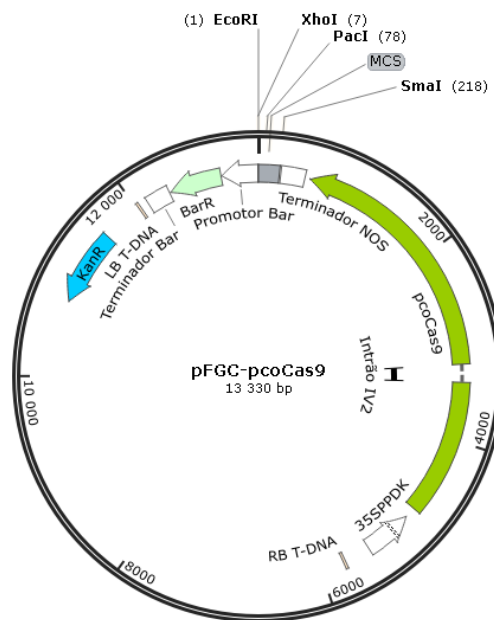


Figura II.3 – Plasmídeo pFGC-pcoCas9.

5.1. Purificação de pUC119-gRNA e pFGC-pcoCas9

Os plasmídeos da Addgene foram recebidos em *stock* de *Escherichia coli*. Após a chegada das bactérias onde estavam inseridos os plasmídeos, foi feito um riscado de cada bactéria em placas de Petri com meio Luria Bertani (LB) agar (ver anexo 1.5) suplementadas com ampicilina (50mg/L, ver anexo 1.7; Duchefa Biochemie, Holanda) para o plasmídeo pUC119-gRNA e suplementadas com canamicina (50 mg/L, ver anexo 1.7) para o plasmídeo pFGC-pcoCas9. As placas foram incubadas a 37°C *overnight* e em seguida foi inoculada uma colónia isolada de cada bactéria em 25 mL de meio LB com ampicilina (para pUC119-gRNA) e canamicina (para pFGC-pcoCas9). Após incubação a 37°C *overnight*, os plasmídeos foram isolados utilizando o kit NZYMiniprep (NZYTech, Portugal).

5.2. Overlapping PCR

Para ser possível integrar o gRNA pretendido na construção, foi executada uma estratégia de *overlapping* PCR (adaptado de Li et al, 2015). Esta estratégia (Figura II.6) consiste em formar um produto final (PF) com a sequência desejada a partir de produtos intermédios (PI), através de várias rondas de PCR. Foram desenhados *primers* específicos (Tabela II.5) para a criação de dois

RNAs guia (gRNA1, ATGGACTCTTCCACCGTTGA e gRNA2, TTACTATCAACTGGGCCGGT) em que foram incorporados locais de restrição (*PacI* e *SmaI* para gRNA1, *EcoRI* e *XhoI* para gRNA2) para ser viável a integração das construções num único plasmídeo.

Tabela II.5 – *Primers* utilizados para construção de gRNA1 e gRNA2. Os locais de restrição estão representados a negrito e sublinhado.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' – 3')
gRNA1 F1	CGA <u>CCCGGG</u> AGAAATCTCAAAATTCCG
gRNA1 R1	TCAACGGTGGAAGAGTCCATCAATCACTACTTCGTCTCT
gRNA1 F2	ATGGACTCTTCCACCGTTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
gRNA1 R2	CGGT <u>TAATTAA</u> AAAAAAGCACCGACTCGGTGC
gRNA2 F1	GCG <u>CTCGAG</u> AGAAATCTCAAAATTCCG
gRNA2 R1	ACCGGCCAGTTGATAGTAACAATCACTACTTCGTCTCT
gRNA2 F2	TTACTATCAACTGGGCCGGGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
gRNA2 R2	TAT <u>GAATTC</u> AAAAAAGCACCGACTCGGTGC

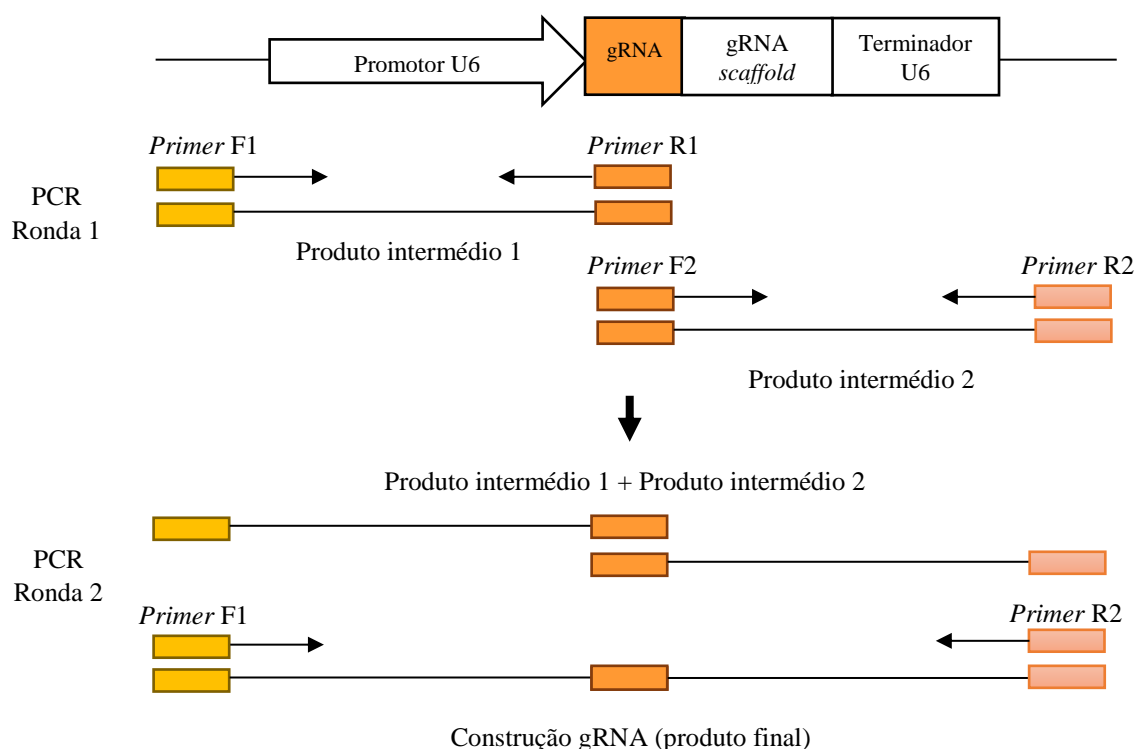


Figura II.4 – Criação de gRNA a partir de uma estratégia de *overlapping PCR* (adaptado de Li et al., 2015).

Foi feita uma *master mix* (Tabela II.6), preparada no gelo, com a NZYTaQ DNA polymerase (NZYTech, Portugal). Foram pipetados 10 µL da reação para cada tubo de PCR a utilizar e os tubos foram introduzidos no termociclador (Eppendorf, Mastercycler) e iniciou-se o programa descrito na Tabela II.7. Após a primeira e segunda rondas de PCR, as amostras foram corridas num gel de 30 mL de agarose 0.8% (ver anexo 1.6) com 0.375 µL de GreenSafe Premium (NZYTech, Portugal) numa tina Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad, EUA) com TBE 0.5x (ver anexo 1.6) a 100V durante 30 minutos. Foram carregados 5 µL de marcador molecular NZYDNA Ladder III (NZYTech, Portugal) juntamente com as amostras preparadas com *Orange G* (10x concentrado; ver anexo 1.6). As bandas correspondentes aos produtos intermédios ou finais foram excisadas e purificadas utilizando o kit NZYGelpure (NZYTech, Portugal).

Tabela II.6 – *Master mix* para *overlapping* PCR. Os *primers* utilizados flanqueiam os PI e PF de gRNA1 e gRNA2.

	Concentração final
Tampão de reação	1x
MgCl₂	2 mM
Primer Forward	0.5 µM
Primer Reverse	0.5 µM
dNTPs (NZYTech, Portugal)	0.2 mM
NZYTaq	0.024 U/µL

Tabela II.7 – Programa de PCR utilizado no termociclador. A temperatura de emparelhamento da 1ª ronda é igual para os PI de gRNA1 e gRNA2 e a temperatura de emparelhamento da 2ª ronda é igual para os PF de gRNA1 e gRNA2.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Emparelhamento	61°C (1ª ronda)	30 segundos	35
	59°C (2ª ronda)		
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1
Hold	4°C	Indefinido	1

5.3. Digestão do plasmídeo pFGC-pcoCas9 e fragmento gRNA

A digestão de gRNA1 e de pFGC-pcoCas9 foi efetuada com FastDigest *SmaI* (Thermo Scientific, EUA) e *PacI* (New England Biolabs, EUA). As digestões foram feitas com *SmaI* a 37°C durante 2 horas, seguida de uma limpeza com o kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research, EUA) e digestão com *PacI* a 37°C durante 4 horas (Tabela II.8). As amostras foram corridas num gel de agarose 0.8% numa tina com TBE 0.5x a 100V durante 30 minutos; as bandas correspondentes ao plasmídeo e ao gRNA1 foram excisadas e purificadas utilizando o kit NZYGelpure.

Tabela II.8 – Digestão de pFGC-pcoCas9, gRNA1 e gRNA2.

Componente	Volume
Água estéril	15 µL
10x Tampão FastDigest	2 µL
DNA	Até 1 µg
Enzima FastDigest (<i>SmaI</i> , <i>EcoRI</i> ou <i>XhoI</i>)	1 µL
DNA	17 µL (após limpeza com o kit)
10x Tampão CutSmart	2 µL
<i>PacI</i>	1 µL

A digestão do fragmento gRNA2 e do plasmídeo pFGC-pcoCas9 foi efetuada com FastDigest *EcoRI* e FastDigest *XhoI* (Thermo Scientific, EUA). As digestões foram feitas com *EcoRI* e *XhoI* a 37°C durante 2 horas (Tabela II.8). As amostras foram corridas num gel de agarose 0.8% numa tina com TBE 0.5x a 100V durante 30 minutos, as bandas correspondentes ao plasmídeo e ao gRNA2 foram excisadas e purificadas utilizando o kit NZYGelpure.

5.4. Ligação de pFGC-pcoCas9 e gRNA

Foram feitas ligações do plasmídeo pFGC-pcoCas9 com o fragmento gRNA1 e/ou gRNA2 após digestão utilizando T4 DNA Ligase (Promega, EUA), com razões de plasmídeo:gRNA de 1:0 (controlo), 1:2, 1:3 e 1:5 (Tabela II.9), tendo em conta os tamanhos do plasmídeo e do gRNA e a quantidade de pFGC-pcoCas9 obtida após a purificação a partir do gel de agarose (calculadora da ligação disponível em http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html). A ligação decorreu a 17°C *overnight*.

Tabela II.9 – Ligação de pFGC-pcoCas9 com gRNA.

	1:0	1:2	1:3	1:5
pFGC-pcoCas9 digerido	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
gRNA1/gRNA2		0.25 µL	0.37 µL	0.62 µL
10x Tampão ligase	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Água estéril	7 µL	6.5 µL	6.63 µL	6.38 µL

6. Preparação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α

Com vista a proceder-se a uma transformação de *E.coli* com plasmídeo pFGC-pcoCas9 com o fragmento gRNA1 e/ou gRNA2, foi necessário preparar células competentes de DH5α.

A preparação de células competentes foi efetuada em condições de esterilidade. As células bacterianas foram retiradas de *stocks* de glicerol a -80°C e foi feito um riscado numa placa de Petri com meio LB agar. A placa foi incubada a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foi selecionada uma colónia isolada de DH5α da placa de Petri e fez-se um pré-inóculo com 25 mL de meio LB líquido. No mesmo dia, autoclavou-se meio LB, 100 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂; Sigma-Aldrich, EUA), 100 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂; NZYTech, Portugal) e 85 mM CaCl₂ com 15% de glicerol. A cultura foi incubada a 37°C *overnight* com agitação (180 rpm; Eppendorf, New Brunswick Innova 44/44R). Após a incubação *overnight*, inoculou-se 100 mL de meio LB com 1 mL de pré-inóculo e incubou-se a 37°C a 180 rpm. A densidade ótica (DO) a 600nm foi medida a cada hora no Nanodrop e medida a cada 20 minutos quando a DO atingiu o valor de 0.2. Quando a DO₆₀₀ chegou a 0.4, a cultura foi colocada no gelo. A cultura foi arrefecida no gelo e foram repartidos 25 mL em tubos de 50 mL previamente colocados no gelo. As células foram centrifugadas a 3000g (Beckman Coulter, Allegra X-12R) a 4°C durante 15 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em 10 mL de 100mM MgCl₂ previamente colocado no gelo. As células foram centrifugadas a 2000g a 4°C durante 15 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de 100mM CaCl₂; os tubos foram deixados no gelo durante 20 minutos. As células foram novamente centrifugadas a 2000g a 4°C durante 15 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de 85 mM CaCl₂ com 15% de glicerol. A amostra foi novamente centrifugada a 1000g a 4°C durante 15 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em 200 µL de 85 mM CaCl₂ com 15% de glicerol. Foram aliqotados 50 µL de células em microtubos de 1.5 mL estéreis em que foi adicionado igual volume de *glycerol stock media* (ver anexo 1.5). As células foram congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

7. Transformação de *E.coli* DH5 α competentes

Retirou-se uma alíquota de 50 μ L de DH5 α competentes a -80°C e deixou-se descongelar no gelo. Adicionou-se 5 μ L da ligação pFGC-pcoCas9+gRNA e incubou-se no gelo durante 30 minutos. Em seguida, a mistura foi incubada num banho a 42°C durante 60 segundos e colocada novamente no gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 900 μ L de meio LB às células e incubou-se a 37°C durante 1 hora a 180 rpm. Prepararam-se placas LB agar suplementadas com canamicina (50 mg/L) e foram deixadas a solidificar. No final da incubação, centrifugou-se durante 3 minutos a 3300g e retirou-se 900 μ L de sobrenadante. Ressuspenderam-se as bactérias nos restantes 100 μ L de sobrenadante e plaqueou-se a transformação em placas LB agar suplementadas com canamicina previamente preparadas. As placas foram incubadas a 37°C *overnight*.

7.1. PCR de colónias de *E. coli* DH5 α transformadas

Após a transformação de *E. coli* DH5 α (ver II.7), procedeu-se a um PCR de colónias. O PCR de colónias utiliza como *template* de DNA colónias isoladas de DH5 α transformadas. Foram previamente preparadas placas de Petri com LB agar suplementadas com canamicina (50 mg/L) e foi feita uma *master mix* (Tabela II.10), preparada no gelo, com o NZYTaQ DNA polymerase, fazendo os cálculos para os tubos necessários a utilizar. Foram pipetados 10 μ L da reação para cada tubo de PCR a utilizar. Em seguida, com a ajuda de pontas de micropipeta estéreis, as colónias isoladas de DH5 α transformadas foram levemente picadas na placa de LB agar previamente preparada com canamicina e identificada (*master plate*) e posteriormente transferidas para os tubos de PCR também devidamente identificados. A *master plate* foi incubada a 37°C *overnight* e os tubos foram introduzidos no termociclador e iniciou-se o programa descrito na Tabela II.11. Concluído o programa de PCR, as amostras foram corridas num gel de agarose 0,8% numa tina com TBE 0.5x a 100V durante 30 minutos para verificação das colónias positivas obtidas.

Tabela II.10 – *Master mix* para PCR de colónias de *E.coli* DH5 α . Os *primers* utilizados flanqueiam a região da construção do gRNA1, gRNA2 ou gRNA1+gRNA2.

	Concentração final
Tampão de reação	1x
MgCl₂	2 mM
Primer Forward	0.5 μ M
Primer Reverse	0.5 μ M
dNTPs (NZYTech, Portugal)	0.2 mM
NZYTaq	0.024 U/ μ L

Tabela II.11 – Programa de PCR utilizado para PCR de colónias de DH5 α para amplificação de gRNA. A temperatura de emparelhamento é igual para gRNA1, gRNA2 e gRNA1+gRNA2.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Emparelhamento	59°C	30 segundos	35
		30 segundos (gRNA1 e gRNA2)	
Extensão	72°C	1 minuto (gRNA1+gRNA2)	
Extensão final	72°C	5 minutos	1
<i>Hold</i>	4°C	Indefinido	1

8. Preparação de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

Foi selecionada a estirpe EHA105 (gentilmente cedida pela Dra. Susana Araújo, do laboratório *Plant Cell Biotechnology* do ITQB), uma vez que não existia incompatibilidade de marcas de resistência entre esta estirpe e o plasmídeo pFGC-pcoCas9 (Klee, 2000). A preparação de células competentes foi efetuada em condições de esterilidade. As células bacterianas foram retiradas de *stocks* de glicerol a -80°C e foi efetuado um riscado numa placa de Petri com meio LB agar suplementado com rifampicina (50 mg/L, ver anexo 1.7; NZYTech, Portugal). A placa foi incubada a 28°C durante 1 a 2 dias. Posteriormente, foi selecionada uma colónia isolada de EHA105 da placa de Petri e fez-se um pré-inóculo com 5 mL de meio LB suplementado com

rifampicina (50 mg/L). No mesmo dia, autoclavou-se meio LB e 10 mM CaCl₂. A cultura foi incubada a 28°C durante 24 horas a 180 rpm (Eppendorf, New Brunswick Innova 2100). Após a incubação, inoculou-se 100 mL de meio LB com 4 mL de pré-inóculo e incubou-se a 28°C a 180 rpm. A DO a 600 nm foi medida a cada hora no Nanodrop após cerca de 2 horas de incubação. Quando a DO₆₀₀ chegou a 0.5-0.6, a cultura foi colocada no gelo. A cultura foi arrefecida no gelo e foram repartidos 25 mL em tubos de 50 mL previamente colocados no gelo. As células foram centrifugadas a 3270g a 4°C durante 15 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de 10mM MgCl₂ previamente colocado no gelo. Foram aliquoteados 100 µL de células em microtubos de 1.5 mL estéreis, congeladas em azoto líquidas e armazenadas a -80°C.

9. Transformação de *A. tumefaciens* EHA105 competentes

Retirou-se uma alíquota de 100 µL de EHA105 competentes de -80°C e deixou-se descongelar no gelo. Adicionou-se 1 µg de DNA e incubou-se no gelo durante 5 minutos. Em seguida, a mistura foi incubada em azoto líquido durante 5 minutos e posteriormente colocada num banho a 37°C durante 5 minutos. Adicionou-se 1 mL de meio LB às células e incubou-se a 28°C durante 2 horas a 180 rpm. Foram preparadas placas LB agar suplementadas com canamicina (50 mg/L) e rifampicina (50 mg/L) e foram deixadas a solidificar. No final da incubação, centrifugou-se durante 2 minutos a 2300g e descartou-se o sobrenadante. Ressuspenderam-se as bactérias em 200 µL e plaqueou-se a transformação em placas LB agar suplementadas com canamicina e rifampicina previamente preparadas. As placas foram incubadas a 28°C durante cerca de 48 horas.

9.1. PCR de colónias de *A. tumefaciens* EHA105 transformadas

Após a transformação de *A. tumefaciens* EHA105, procedeu-se a PCR de colónias. Foram previamente preparadas placas de Petri com LB agar suplementadas com canamicina (50 mg/L) e rifampicina (50 mg/L) e foi feita uma *master mix* (Tabela II.8). Foram pipetados 10 µL da reação para cada tubo de PCR a utilizar. Em seguida, as colónias isoladas de EHA105 transformadas foram levemente picadas na *master plate* e posteriormente transferidas para os tubos de PCR. A *master plate* foi incubada a 28°C durante cerca de 48 horas (Figura II.7). Os tubos foram então introduzidos no termociclador e iniciou-se o programa descrito na Tabela II.9, com a alteração do tempo de desnaturação inicial para 10 minutos. Concluído o programa de PCR, as amostras foram corridas num gel de agarose 0.8% numa tina com TBE 0.5x a 100V durante 30 minutos para verificação das colónias positivas obtidas.

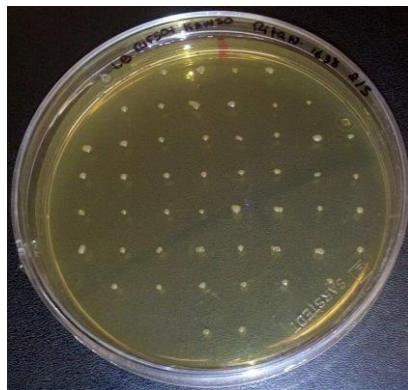


Figura II.5 - Master plate de EHA105.

10. Transformação de *N. tabacum* BY-2 mediada por *A. tumefaciens*

Após a confirmação de colónias positivas de *A. tumefaciens* EHA105 transformadas com pFGC-pcoCas9 com gRNA1, é aconselhável que a transformação da linha BT seja feita o mais brevemente possível. As colónias positivas isoladas da *master plate* foram colocadas em 5 mL de meio LB suplementado com canamicina (50 mg/L) e rifampicina (50 mg/L) e incubadas a 28°C durante 1 a 2 dias até a DO_{600} chegar a 1.5. No dia da transformação, retiraram-se 4 mL de células BY-2 que expressam L-PGDS com 4 dias, para placas de Petri de 55 mm onde foram adicionados 100 μ L de cultura de *A. tumefaciens* EHA105 transformada. Após uma agitação ligeira, as placas foram seladas com fita Micropore e incubadas a 24°C durante 64 horas em câmara escura. Em seguida adicionaram-se 4 mL de meio MS fresco à co-cultura e seguiu-se uma breve homogeneização. Foram retirados 500 μ L da cultura que foram colocados em placas de Petri com MS com gelrite (permite um melhor contacto das células com os nutrientes devido à sua permeabilidade comparativamente com o agar) previamente preparadas (ver anexo 1.4) e suplementadas com canamicina (100 mg/L), timentina (500 mg/L, para eliminação de *A. tumefaciens*) e glufosinato de amónio (ver anexo 1.7) a diferentes concentrações (5, 10 e 20 mg/L, Sigma-Aldrich, EUA, para seleção de culturas transformadas). A cultura foi espalhada apenas por inclinação da placa de Petri. As placas foram mantidas em câmara escura a 24°C durante aproximadamente 4 semanas. Quando se começaram a observar *microcalli* (após 4 a 5 semanas), estes foram transferidos para novas placas com meio MS sólido suplementadas com canamicina, timentina e glufosinato de amónio (20 mg/L). Passadas 2 semanas, os *calli* foram transferidos para tubos de ensaio com 5 mL de meio MS líquido suplementado com canamicina (100 mg/L) e glufosinato de amónio (20 mg/L). Os tubos de ensaio foram incubados num agitador a 24°C a 125 rpm (Gerhardt, Laboshake) no escuro.

11. Viabilidade celular de *N. tabacum* BY-2 BT

Foi analisada a viabilidade celular de todas as culturas transgênicas obtidas. Para cada cultura, foram retirados 500 µL de cultura para um microtubo estéril e foi adicionado igual volume de corante azul tripano (ver anexo 1.8). Em seguida, foram adicionados 10 µL de cada solução numa lâmina de microscópio e cobertas com uma lamela. As preparações foram observadas no microscópio (Leica Microsystems, DM6 B) e as imagens foram obtidas com o *software* Leica Application Suite X.

III. Resultados e Discussão

1. Caracterização da curva de crescimento de *N. tabacum* BY-2 que expressa L-PGDS (linha BT)

Foi efetuada uma repicagem da *N. tabacum* BY-2 que expressa L-PGDS (designada por linha BT) com o objetivo de caracterizar a curva de crescimento destas culturas celulares. A curva de crescimento de BY-2 *wild type* possui uma duração de 7 dias (Nagata et al., 1992). Sendo a linha BT uma linha transformada e tendo sido observado de forma empírica um atraso no seu crescimento comparativamente às culturas *wild type*, o ensaio decorreu durante 14 dias. Foram medidos os pesos secos das culturas em suspensão aos dias 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14, com quatro replicados biológicos para cada dia. O pré-inóculo inicial, a obtenção do peso seco das culturas de células vegetais em suspensão e a quantificação da proteína total presente no meio de cultura encontram-se descritos nos materiais e métodos. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura III.1.

Após a secagem dos papéis de filtro contendo as células obtidas por filtração a vácuo, os papéis de filtro foram pesados e subtraiu-se o valor do papel para a obtenção do peso seco efetivo das células da linha BT. A partir do gráfico apresentado abaixo, relativamente à curva de crescimento (representada a azul), é possível concluir que a fase estacionária tem uma duração de 4 dias (dia 0 a dia 4), a fase exponencial é iniciada a partir do dia 4.

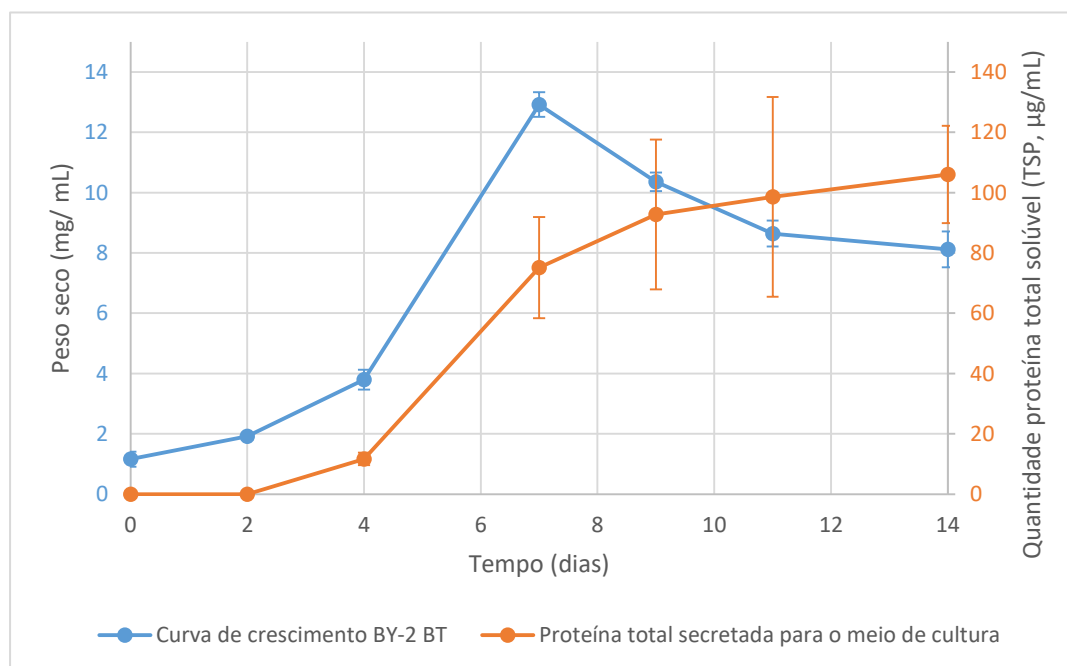


Figura III.1 – Caracterização da curva de crescimento (azul) e quantidade de proteína total solúvel secretada para o meio de cultura (laranja) da linha BT. As barras representadas referem-se ao desvio padrão. TSP – proteína solúvel total.

Para averiguar qual a quantidade de proteína total presente no meio de cultura da linha BT, foi utilizado o método de Bradford. Foram efetuados 3 replicados técnicos de cada amostra. Como se pode observar na Figura III.1, é possível observar um aumento mais acentuado de proteína total solúvel no meio de cultura entre os dias 4 e 7, o que corresponde à fase exponencial quando observada a curva de crescimento.

2. Quantificação relativa de L-PGDS presente no meio de cultura de BY-2 BT

De forma a determinar a quantidade relativa de L-PGDS presente no meio de cultura, as amostras foram preparadas e as proteínas separadas por SDS-PAGE. Corou-se um dos géis com BlueSafe e o segundo foi utilizado para *western blot* e consequente imunodeteção conforme indicado nos materiais e métodos. Como se pode observar na Figura III.2, é possível verificar a presença de L-PGDS (entre 23 a 25 kDa) no meio de cultura destas células vegetais em suspensão. É de salientar que se observa uma quantidade máxima de L-PGDS no dia 7. Do dia 7 ao dia 14, a quantidade de L-PGDS mantém-se semelhante. É ainda possível observar uma diferença no peso molecular de L-PGDS entre o dia 4 e o dia 7. Esta alteração pode estar relacionada com o grau de glicosilação da proteína pois ao dia 4 parecem estar presentes várias glicoformas, o que não se observa no dia 7.

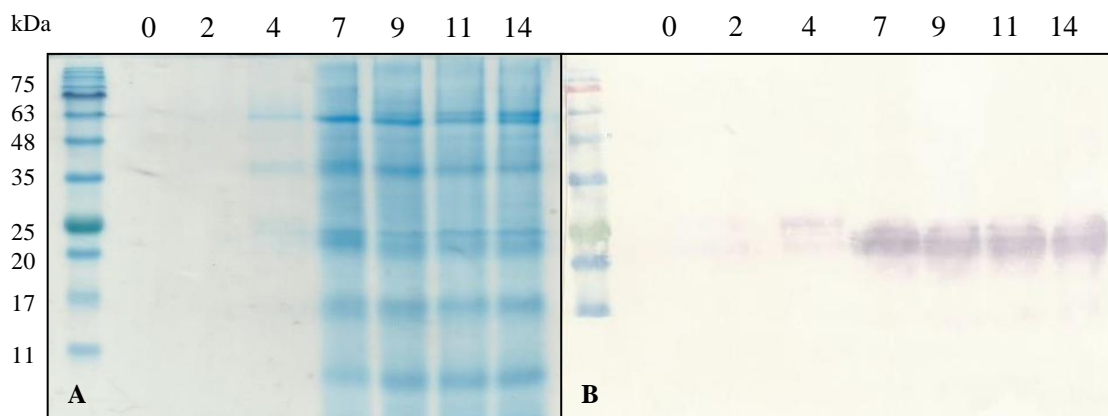


Figura III.2 – Análise de L-PGDS no meio de cultura de BY-2 BT por SDS-PAGE (A) e *western blot* (B). Os números 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14 correspondem ao dia em que foi recolhido o meio de cultura.

3. Verificação da sequência de *HDA6*

A partir da estratégia selecionada para aumentar a quantidade de L-PGDS na linha BT, foi escolhido inativar um gene envolvido em silenciamento de transgenes, o gene *HDA6* que codifica para a histona desacetilase 6 (Murfett et al., 2001), utilizando a técnica CRISPR-Cas9. Assim, foi necessário em primeiro lugar verificar se a linha BT continha a sequência de *HDA6* exatamente

igual à sequência disponível no Genbank, que na altura se encontrava anotada como *predicted* (NCBI XM_016658646.1).

Para ser possível verificar a sequência do primeiro exão de *HDA6* (uma vez que os *knock-outs* iriam ser efetuados apenas no primeiro exão), o DNA genómico foi extraído e foi realizado um PCR utilizando *primers* que flanqueavam o primeiro exão para amplificação do fragmento, conforme descrito nos materiais e métodos. Após confirmação do tamanho correto (cerca de 635 pb; Figura III.3), procedeu-se à sequenciação do respetivo fragmento. Foi observado um polimorfismo por substituição de um nucleótido num codão isoleucina relativamente próxima do local do sítio ativo (Figura III.4, assinalado com seta vermelha), mas sem qualquer consequência na sequência de aminoácidos da proteína HDA6, permanecendo uma isoleucina.

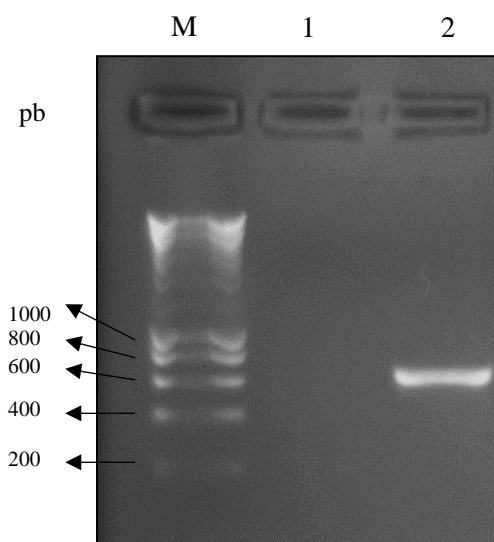


Figura III.3 – Gel de eletroforese resultante de PCR do primeiro exão de *HDA6* (635 pb). M - Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 - Controlo negativo (sem DNA genómico); 2 - Produto de PCR.

```

TCTCAGTCCGAGCCCAAAAGTAGTGGCCCATGGACTCTTCCACCGTTGACGGCAGCGCGT
TCTCAGTCCGAGCCCAAAAGTAGTGGCCCATGGACTCTTCCACCGTTGACGGCAGCGCGT
CGCTTCCATCCACCGGAACCGACGCGAAGAAGCGCGGTGTCTCATACTTCTACGAGCCCA
CGCTTCCATCCACCGGAACCGACGCGAAGAAGCGCGGTGTCTCATACTTCTACGAGCCCA
CAATCGGCGACTATTACTACGGGCAAGGTCACCCAATGAAGCCTCACCGTATACGTATGG
CAATCGGCGACTATTACTACGGGCAAGGTCACCCAATGAAGCCTCACCGTATACGTATGG
CCCACAATCTCATCGTGCAC TACTACCTACACCGTCGTATGGAATCAGTCGCCCTTTTC
CCCACAATCTCATCGTGCAC TACTACCTACACCGTCGTATGGAATCAGTCGCCCTTTTC
CGGCGGGTCCCAGATGACATTGCGCGGTTCCACTCGCCGGACTACGTGCGACTTCCTTTCTT
CGGCGGGTCCCAGATGACATTGCGCGGTTCCACTCGCCGGACTACGTGCGACTTCCTTTCTT
CCGTTTCGCGCGAGACTCTTTCATGACCATACCCACGCGCGTCATCTCAAACGCTTCAATG
CCGTTTCGCGCGAGACTCTTTCATGACCATACCCACGCGCGTCATCTCAAACGCTTCAATG
TTGGTGAGGACTGCCCTGTTTTGATGGGCTTTTCGGGTTTTGTCAGGCTTCTGCTGGTG
TTGGTGAGGACTGCCCTGTTTTGATGGGCTTTTCGGGTTTTGTCAGGCTTCTGCTGGTG
GATCTATTGGTGCTGCTGTTAAGCTTAATAGGCAAGACGCTGATATTACTATCAACTGGG
GATCTATTGGTGCTGCTGTTAAGCTTAATAGGCAAGACGCTGATATTACTATCAACTGGG
CCGGTGGGCTCCACCATGCAaaaaaaaaGTGAAGCTTCTGGATTTTGCTATGTCAATGATA
CCGGTGGGCTCCACCATGCAAAAAAAAAAGTGAAGCTTCTGGATTTTGCTATGTCAATGATA
TTGTTCTCGGTATTCTT
TTGTTCTCGGTATTCTT

```

Figura III.4 - Alinhamento da sequenciação obtida com o *primer forward* de *HDA6* com a sequência fornecida (NCBI XM_016658646.1). O polimorfismo está representado a vermelho; o aminoácido que contribui diretamente para a atividade enzimática está representado a azul; os RNA guias estão representados a laranja; os motivos PAM estão representados a verde.

4. Construção de gRNA1 e gRNA2 por *overlapping PCR*

Na literatura é geralmente referido que a inativação por CRISPR-Cas9 deve ser efetuada utilizando um gRNA direcionado para os exões mais próximos da extremidade 5' (Bortesi et al., 2016; Shalem et al., 2014; Wang et al., 2014). Deste modo, podem surgir mutações *frameshift* que podem originar codões de *stop* prematuros, levando à criação de proteínas não funcionais (Ran et al., 2013). No entanto, segundo Shi et al (2015), este tipo de abordagem produz frequentemente variantes *in-frame* que retêm a sua funcionalidade. Para ultrapassar esta limitação, a mutagénese por CRISPR-Cas9 pode ser direcionada para os domínios funcionais da proteína alvo, o que gera uma proporção superior de mutações *null*. O sistema CRISPR-Cas9 permite ainda a incorporação de diversos gRNAs num único vector para que sejam possíveis diversas mutações direcionadas em simultâneo (Schaeffer & Nakata, 2015). Estas mutações podem ser direcionadas a diversos genes ou a diferentes locais num único gene (Ma et al., 2015).

Para o *knockout* de *HDA6*, optou-se pela criação de dois RNAs guia (gRNA): um gRNA localizado na extremidade 5' do gene (gRNA1) e outro localizado próximo do sítio ativo de *HDA6* (gRNA2), ambos localizados no exão mais próximo da extremidade 5' (Figura III.4).

Foram elaboradas três estratégias diferentes: inserção de gRNA1 em pFGC-pcoCas9, inserção de gRNA2 em pFGC-pcoCas9 e inserção de gRNA1+gRNA2 em pFGC-pcoCas9.

A partir de uma estratégia de *overlapping* PCR e com o auxílio de um plasmídeo *template* (descritos nos materiais e métodos), foram obtidos fragmentos intermédios (PI) a partir dos quais são criados os gRNAs finais (PF) flanqueados pelo promotor U6, gRNA *scaffold* (semelhante a tracrRNA) e terminador. Os primeiros produtos intermédios obtidos (PI1, fragmento que engloba o promotor e o RNA guia) têm um tamanho aproximado de 330 pb e os segundos produtos intermédios obtidos (PI2, fragmento que engloba o RNA guia, gRNA *scaffold* e terminador) possuem um tamanho de cerca de 110 pb (Figura III.5). Os produtos finais têm um tamanho de cerca de 420 pb (Figura III.6). As bandas correspondentes aos produtos intermédios ou finais foram excisadas e purificadas.

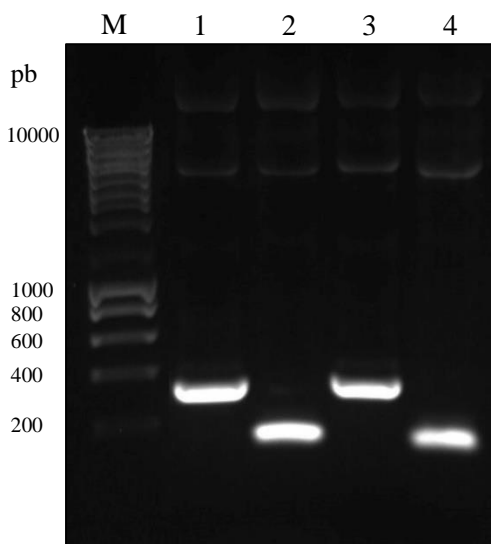


Figura III.5 – Gel de eletroforese resultante de PI de gRNA1 e gRNA2. M – Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 e 3 – PI1 de gRNA1 e gRNA2, respetivamente; 2 e 4 – PI2 de gRNA1 e gRNA2, respetivamente.

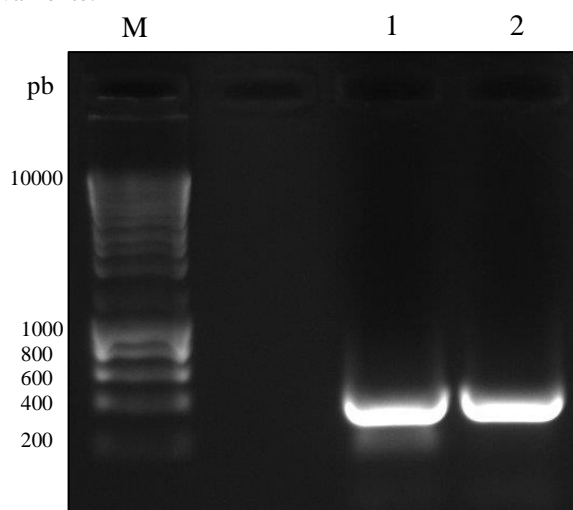


Figura III.6 – Gel de eletroforese resultante de PF de gRNA1 e gRNA2. M – Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 – PF de gRNA1; 2 – PF de gRNA2.

5. Inserção de gRNA em pFGC-pcoCas9

Após a obtenção de gRNA1 e gRNA2, é necessário proceder à digestão do plasmídeo pFGC-pcoCas9 e dos gRNAs e posterior ligação. A inserção dos gRNAs no plasmídeo pFGC-pcoCas9 foi realizada de forma sequencial, iniciando com gRNA2. Na primeira tentativa de clonagem de gRNA2, em que se efetuou um passo de ligação de 2 horas à temperatura ambiente, não se observou crescimento de colónias em placas de Petri contendo meio sólido suplementado com os antibióticos adequados. Assim, quando foi realizada uma nova clonagem de gRNA2, foram mudados os parâmetros no passo de ligação para 17°C *overnight*. Após observação de crescimento de colónias, o passo de ligação foi sempre efetuado a 17°C *overnight* para ambos os gRNAs.

Após a ligação, foi efetuada uma transformação de DH5α com o objetivo de posteriormente isolar o plasmídeo. Para verificar qual das colónias continha o plasmídeo com o gRNA desejado foi feito um PCR de colónias. Após a seleção de colónias positivas, isolou-se pFGC-pcoCas9+gRNA2 e confirmou-se de novo por PCR (Figura III.7). O plasmídeo foi sequenciado para confirmação da sequência de gRNA2 (promotor, gRNA, gRNA *scaffold* e terminador).

Em relação ao gRNA1, após várias tentativas de transformação para obtenção de colónias positivas contendo o plasmídeo com o gRNA desejado e verificação por PCR de colónias, não foi possível isolar pFGC-pcoCas9+gRNA1 (Figura III.8). Após o sucesso com a obtenção de gRNA2, o passo seguinte foi tentar inserir neste plasmídeo o fragmento de gRNA1, ficando pFGC-pcoCas9+gRNA1+gRNA2. Efetuou-se novamente uma digestão, ligação e transformação,

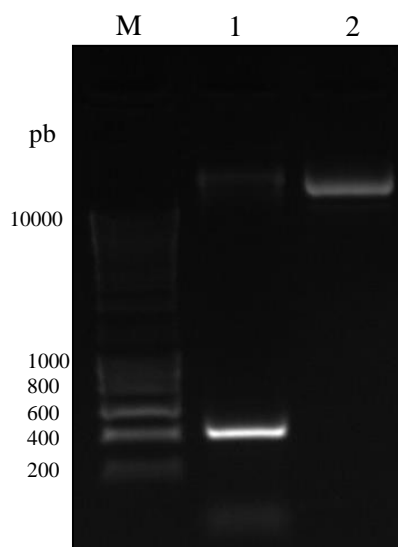


Figura III.7 – Gel de eletroforese resultante de PCR de pFGC-pcoCas9+gRNA2 (~420 pb). M – Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 – pFGC-pcoCas9+gRNA2; 2 – pFGC-pcoCas9 sem gRNA.

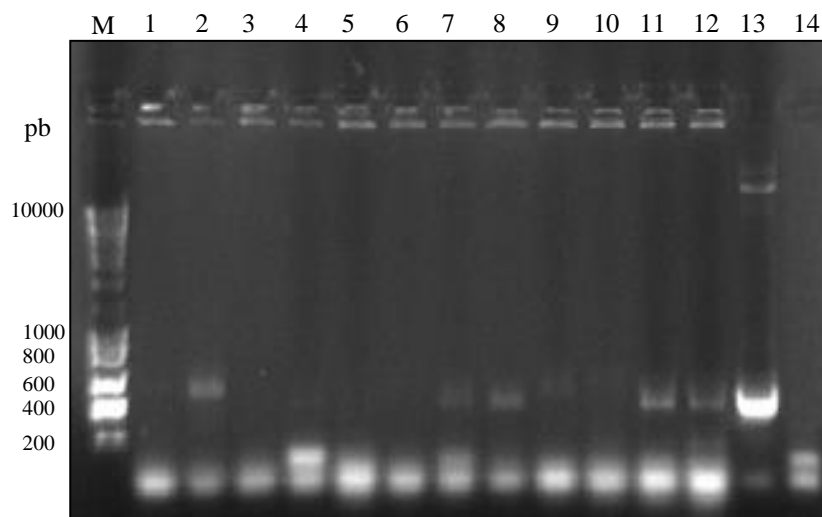


Figura III.8 – Gel de eletroforese resultante de PCR de colônias de DH5α transformadas com pFGC-pcoCas9+gRNA1 (~420 pb). M – Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 a 12 – Colônias isoladas de DH5α; 13 – Controle positivo (plasmídeo); 14 – Controle negativo da reação.

desta vez de pFGC-pcoCas9+gRNA2 com gRNA1 e verificou-se novamente por PCR de colônias. Foi obtida uma colônia presumivelmente positiva. O plasmídeo foi isolado e, devido à quantidade reduzida de plasmídeo obtido, foi efetuada uma nova transformação. No entanto, após nova transformação, observou-se por PCR de colônias que todas as bactérias verificadas continham duas cópias diferentes: uma de pFGC-pcoCas9+gRNA2 sem gRNA1 (banda inferior, ~600 pb) e outra com pFGC-pcoCas9+gRNA2+gRNA1 (banda superior, ~1000 pb), como se pode verificar na Figura III.9.

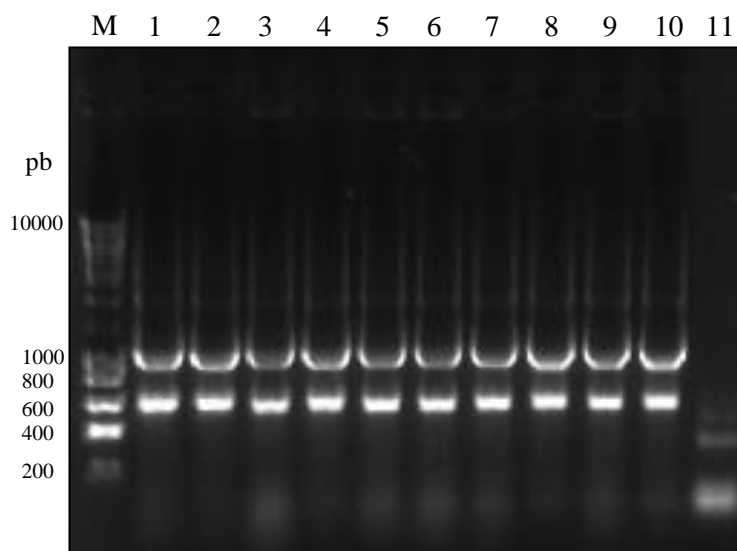


Figura III.9 – Gel de eletroforese resultante de PCR de colônias de pFGC-pcoCas9+gRNA1+gRNA2 (~1000 pb). M – Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 a 10 – Colônias isoladas selecionadas de DH5α; 11 – Controle negativo.

Face a este problema, foram criadas duas estratégias para ser possível a separação dos dois plasmídeos: separação por nova transformação (após a divisão das bactérias, os plasmídeos poderiam eventualmente separar-se) e separação em gel de agarose (após corrida num gel de agarose durante várias horas, os plasmídeos poderiam ter um tamanho suficientemente distinto entre eles para ser possível o seu isolamento e purificação). Seguindo a primeira estratégia, após ser efetuada uma nova transformação, foi efetuada a separação dos dois plasmídeos. No entanto, as colónias verificadas por PCR de colónias apresentaram apenas o plasmídeo com gRNA2 sem gRNA1 (Figura III.10). Alternativamente, foi executada a estratégia de separação por corrida em gel de agarose. Primeiramente utilizou-se um gel de agarose 0.8% e a amostra foi corrida durante 4 horas e 30 minutos a 100 V (Figura III.11). Posteriormente, modificou-se a percentagem de agarose para 1.6% e a amostra foi corrida durante 6 horas e 30 minutos a 100 V (Figura III.12). Como se pode observar pelas figuras III.11 e III.12, não foi possível separar os plasmídeos utilizando esta estratégia. Devido a constrangimentos de tempo, e uma vez que o gRNA2 era mais relevante do que o gRNA1 para o objetivo pretendido (Shi et al., 2015), foi decidido continuar o trabalho utilizando apenas o gRNA2.

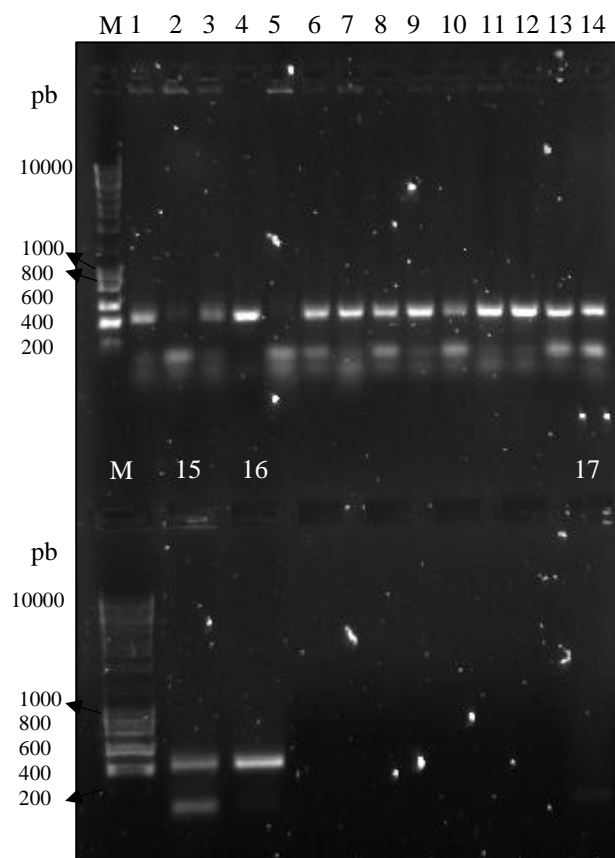


Figura III.10 – Gel de eletroforese resultante de PCR de colónias de pFGC-pcoCas9+gRNA1+gRNA2 (~1000 pb) após nova transformação. M – Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 a 16 – Colónias isoladas selecionadas de DH5 α ; 17 – Controlo negativo.

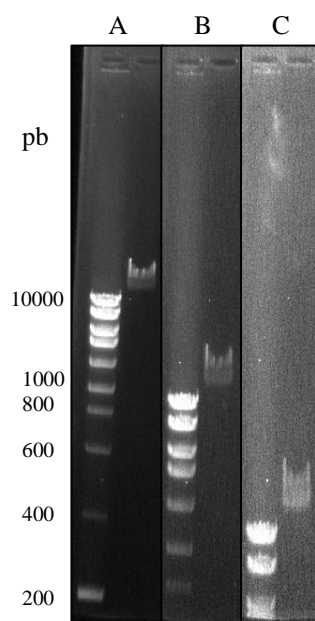


Figura III.11 – Gel de agarose 0.8%. Corrida da amostra durante 2 horas e 30 minutos (A), 3 horas e 30 minutos (B) e 4 horas e 30 minutos (C).

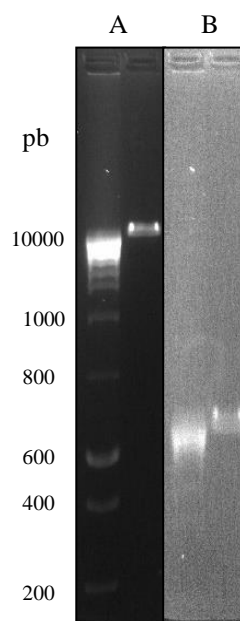


Figura III.12 – Gel de agarose 1.6%. Corrida da amostra durante 3 horas (A) e 6 horas e 30 minutos (B).

6. Transformação de *Agrobacterium* com pFGC-pcoCas9+gRNA2

Após a obtenção de pFGC-pcoCas9+gRNA2, selecionou-se uma estirpe de *Agrobacterium* para ser possível transformar *N. tabacum* BY-2. A estirpe escolhida foi EHA105, uma vez que não existia incompatibilidade de marcas de resistência entre esta estirpe e o plasmídeo pFGC-pcoCas9 (Klee, 2000). Assim, procedeu-se à transformação em EHA105 com o plasmídeo contendo o gRNA2 e posterior verificação por PCR de colónias (Figura III.13). O tempo entre a

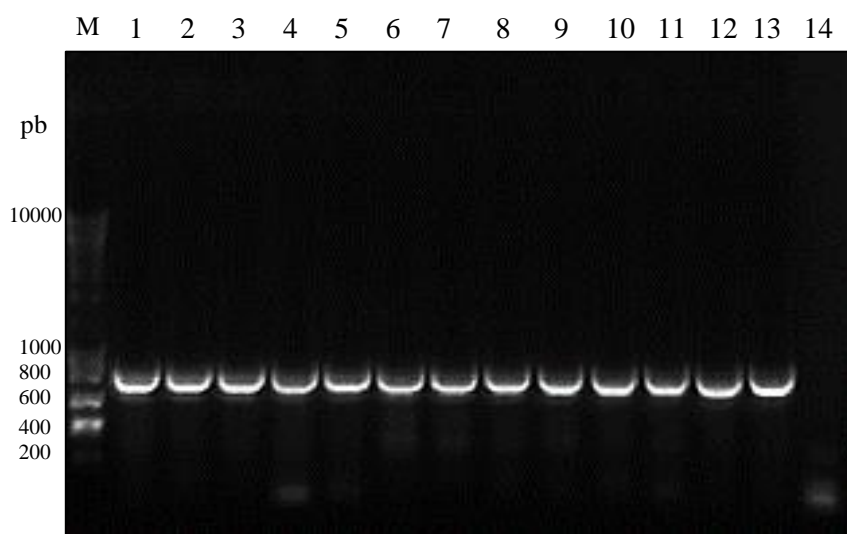


Figura III.13 – Gel de eletroforese resultante de PCR de colónias de pFGC-pcoCas9+gRNA2 (~750 pb) em EHA105. M – Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 a 13 – Colónias isoladas selecionadas de EHA105; 14 – Controlo negativo.

transformação de *Agrobacterium* e a transformação em BY-2 deve ser o mais curto possível, pois existe a possibilidade desta bactéria perder o plasmídeo, e por isso é recomendável executar o PCR de colónias 48 horas antes de se efetuar o pré-inóculo para transformação de BY-2 (devem esperar-se 48 horas para ser possível selecionar colónias isoladas da *master plate*). Para esta verificação a partir de PCR de colónias foram utilizados *primers* diferentes daqueles que foram utilizados para a sequenciação do produto de PCR obtido (os *primers* utilizados para o *overlapping* PCR não eram os mais adequados para sequenciação, pois não era possível sequenciar a parte inicial do promotor). Assim, foram desenhados novos *primers* que flanqueavam uma região anterior ao promotor e posterior ao terminador, sendo o tamanho do produto de PCR pretendido de aproximadamente 750 pb.

7. Transformação da linha BT com pFGC-pcoCas9+gRNA2

A transformação da cultura líquida BT foi feita de acordo com o descrito na secção 10 dos Materiais e Métodos (Figura III.14). Cerca de 1 semana após a transformação, começaram a surgir os primeiros *calli*. As placas continham uma pressão de seleção com glufosinato de amónio com concentrações de 5 mg/L, 10 mg/L e 20 mg/L. Quando os *calli* atingiram o tamanho aproximado de 1 a 2 cm, foi feito o estabelecimento de culturas líquidas de acordo com o descrito na secção 10 dos Materiais e Métodos. Foram assim obtidas oito linhas transgénicas a partir dos *calli* selecionados.

Paralelamente à transformação de BT, foi efetuada a mesma transformação em BY-2 *wild type*, uma linha que não expressa L-PGDS. A transformação em BY-2 *wild type* foi realizada duas vezes, pois na primeira tentativa não se observou crescimento de *calli*. Na segunda tentativa o resultado foi idêntico, uma vez que não ocorreu crescimento em meio sólido novamente. O facto destas transformações não terem sido bem-sucedidas sugere que este gene pode ser relevante em certos mecanismos celulares.

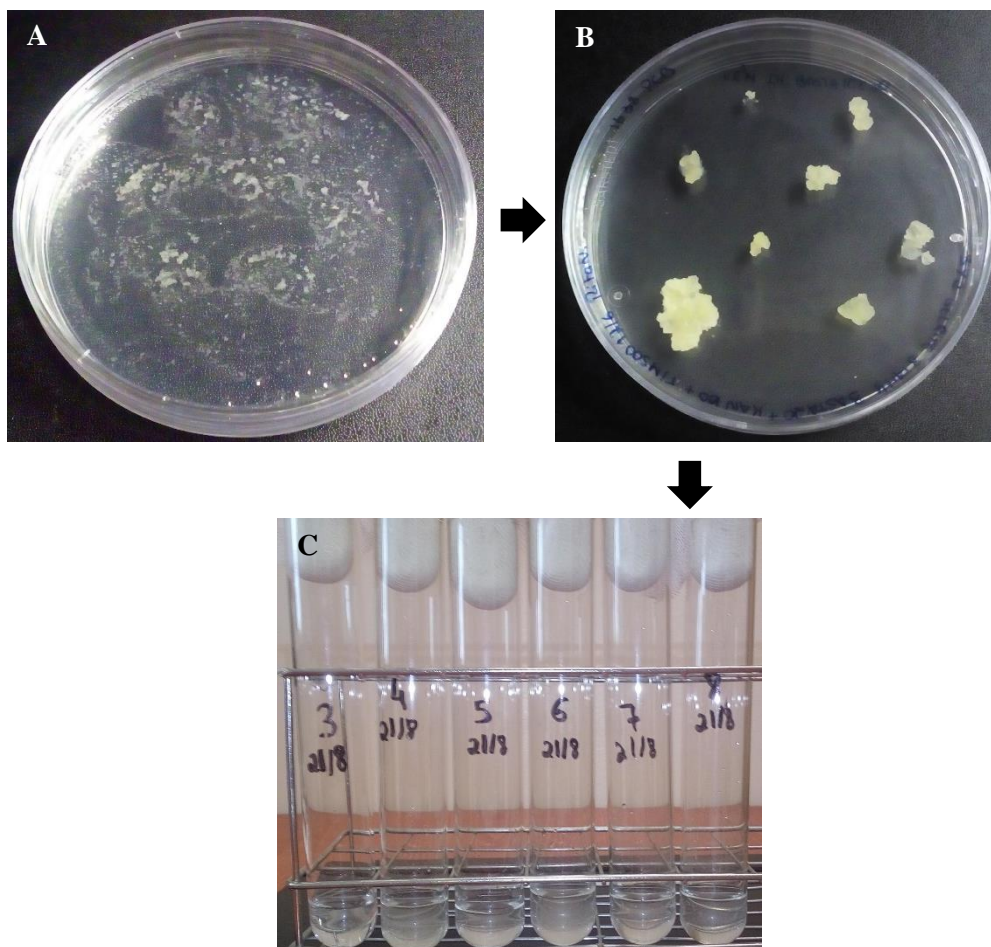


Figura III.14 – Passos de transformação de BY-2 BT com pFGC-pcoCas9+gRNA2. A – Co-cultura de *Agrobacterium tumefaciens* e cultura BY-2 BT em placas de Petri com gelrite suplementada com canamicina, timentina e glufosinato de amónio; B – Passagem de *calli* para nova placa com gelrite suplementada com canamicina, timentina e glufosinato de amónio; C – Transferência de *calli* para MS líquido suplementado com canamicina e glufosinato de amónio.

8. Caracterização das linhas BT transformadas com CRISPR-Cas9

Após sucessivas subculturas durante cerca de 2 meses e meio das linhas 3 a 8 obtidas em cultura líquida, observou-se uma ausência de desenvolvimento das células, uma vez que a densidade celular observada permanecia sem alterações.

De modo a excluir a possibilidade de que as linhas BY-2 obtidas não tivessem sido efectivamente transformadas e não contivessem o plasmídeo pFGC-pcoCas9+gRNA2, foi extraído DNA genómico das linhas 3, 5 e 7 (nas restantes linhas não foi possível obter uma quantidade de células suficiente para extração de DNA genómico) e foi realizado um PCR utilizando os *primers* que flanqueavam a região do promotor e do terminador de gRNA2 (cerca de 420 pb).

Como é possível observar na Figura III.15, duas das três linhas analisadas revelaram a presença do transgene, confirmando assim que pelo menos estas duas linhas foram transformadas com sucesso.

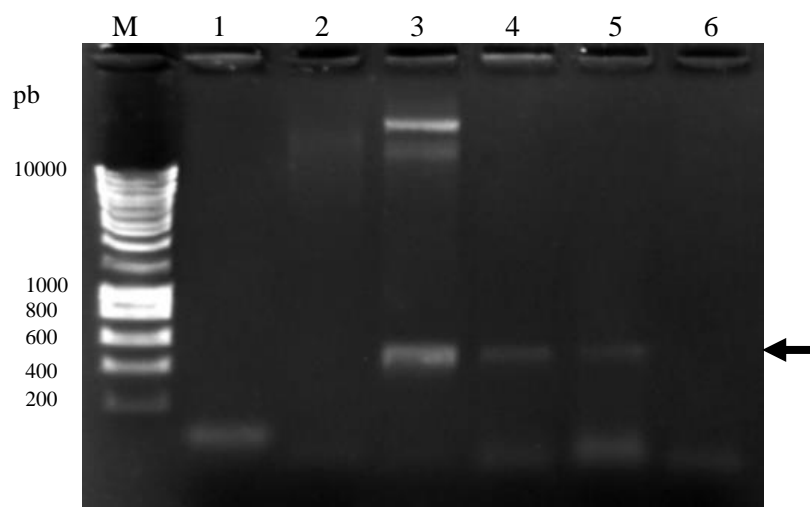


Figura III.15 – Gel de eletroforese resultante de PCR de pFGC-pcoCas9+gRNA2 (~420 pb) em linhas BT transformadas. M – Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; 1 – Controle negativo da reação de PCR; 2 – Controle negativa (linha BT); 3 – Controle positivo; 4 – Linha 7; 5 – Linha 3; 6 – Linha 5.

A ausência de desenvolvimento observada nas linhas transgênicas poderá ser consequência de diversos aspetos, referidos posteriormente no texto. No entanto, uma das hipóteses que poderia explicar a falta de densidade celular seria um possível efeito tóxico do glufosinato de amónio, pois este não é o método de seleção mais comumente utilizado em culturas BY-2. Como o plasmídeo pFGC-pcoCas9 continha a resistência para este herbicida, este foi o utilizado como marca de seleção. Assim, a concentração de glufosinato de amónio adicionada ao meio de cultura foi reduzida de 20 mg/L para 5 mg/L. No entanto, após 3 semanas, não foram observadas quaisquer alterações nas culturas líquidas.

Para averiguar se tinha ocorrido morte celular, foi analisada a viabilidade celular (conforme descrito nos Materiais e Métodos) utilizando o corante azul tripano. Foram analisadas ao microscópio amostras de todas as 6 linhas obtidas, assim como uma cultura da linha BT não transformada como controlo. Apenas na linha 6 foi possível obter preparações de microscópio com número de células suficiente para tirar conclusões. Anteriormente à observação com corante, a morfologia celular foi analisada. Como se pode observar na Figura III.16, a linha 6 apresentava algumas anomalias celulares, como dimensão reduzida dos núcleos (Figura III.16A), colapso do citoplasma e de núcleos (Figura III.16B). A morfologia celular obtida na linha BT é a morfologia normal destas células (Figura III.17).

Após adição do corante para análise de viabilidade celular, verificou-se que todas as células da linha 6 apresentavam coloração no citoplasma e no núcleo, indicativa de morte celular. Adicionalmente, algumas células da linha 6 exibiam ainda uma dimensão nuclear reduzida

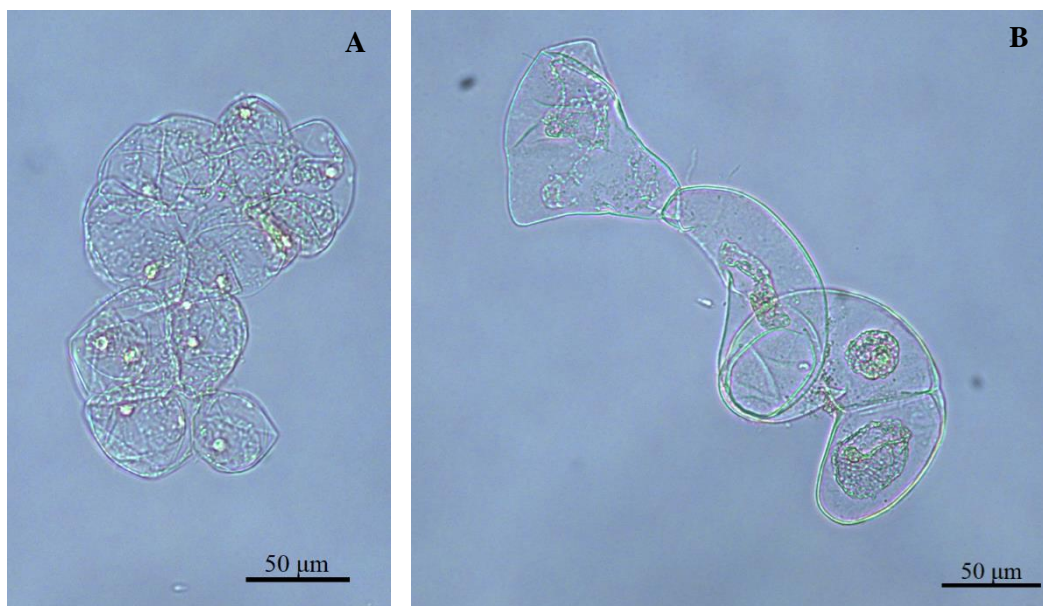


Figura III.16 – Anomalias observadas na morfologia celular da linha 6: núcleos reduzidos (A), colapso do citoplasma e de núcleos (B).



Figura III.17 – Morfologia celular da linha BT.

(indicada na Figura III.18A com uma seta) quando comparadas com as células encontradas na linha BT (Figura III.18B). Como se pode observar na Figura III.19, algumas das células da linha 6 encontravam-se agregadas, o que não acontece nas células da linha BT.

Uma vez que a ausência de crescimento celular foi observada em todas as linhas, é pouco provável que esta ocorrência esteja relacionada com o local de integração do transgene no genoma de BY-2, apesar da integração de transgenes no genoma poder interromper um gene essencial para o desenvolvimento celular.

Existem várias hipóteses possíveis para explicar a ocorrência da morte celular nas linhas transformadas. Este evento pode estar associado com as concentrações utilizadas da marca de

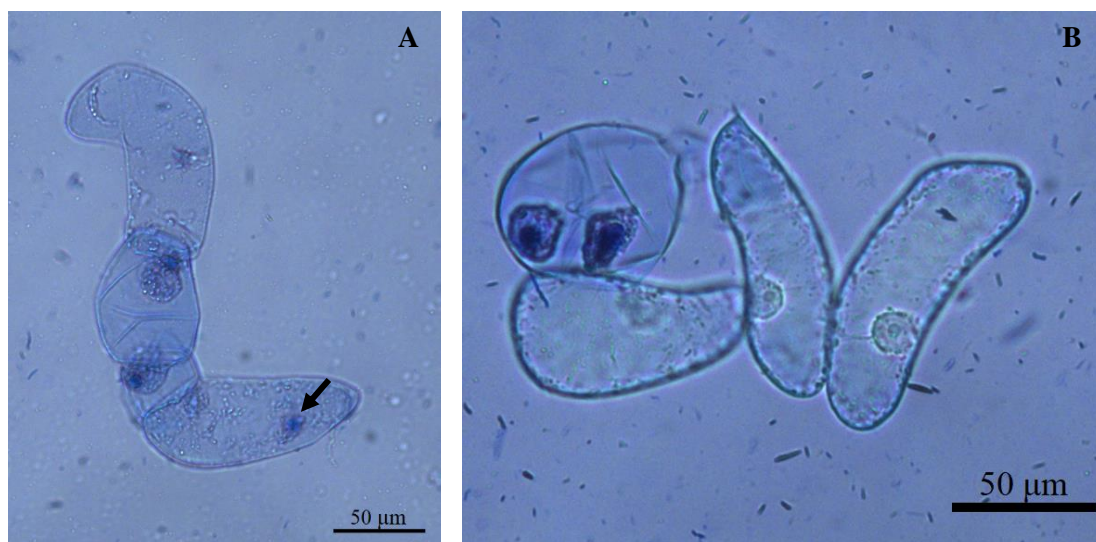


Figura III.18 – Viabilidade celular da linha 6 (A) e linha BT (B).

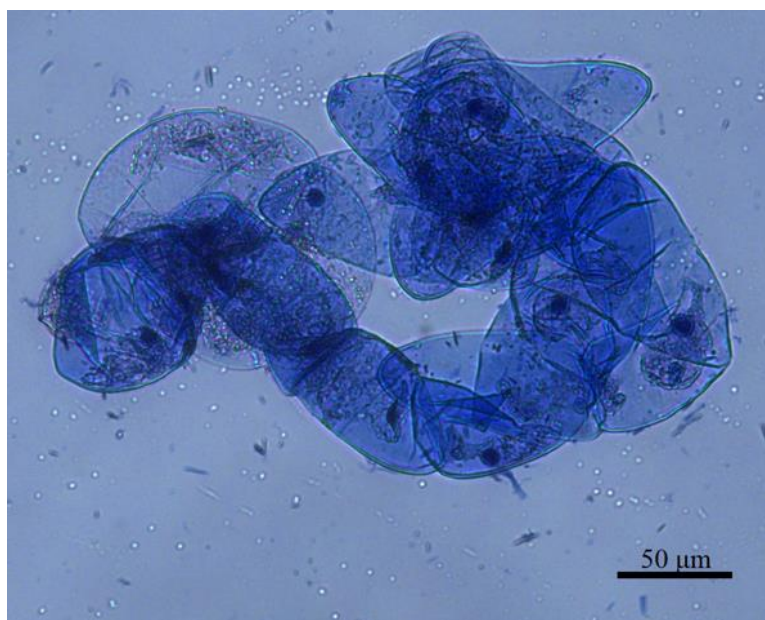


Figura III.19 – Agregação celular da linha 6.

seleção (glufosinato de amónio). O facto de se ter observado crescimento de *calli* em meio sólido com concentrações de glufosinato de amónio em 5mg/L, 10 mg/L e 20 mg/L mas não em meio líquido com concentrações de 20 mg/L e, posteriormente, com 5 mg/L, pode dever-se a um maior número de células estar em contacto com o meio de cultura quando se encontram em meio líquido, encontrando-se as células já em morte celular quando foi reduzida a concentração de glufosinato de amónio.

Para além da toxicidade do herbicida de seleção utilizado, outra possível explicação pode estar relacionada com a inativação do gene *HDA6* através do sistema CRISPR-Cas9 e subsequente alteração do desenvolvimento. Apesar de estarem documentados diversos efeitos de *HDA6* a nível epigenético em plantas (referidos na Introdução), este gene pode estar envolvido em processos de

divisão e desenvolvimento celulares que, após a inativação deste gene, levam à morte celular. O presumível *knock-out* de *HDA6* pode ainda levantar a repressão génica desta desacetilase sobre alguns genes que podem causar mutações que influenciam o desenvolvimento celular, por exemplo transposições (Tian & Chen, 2001), podendo levar à morte celular.

A interação de *HDA6* com outros genes pode ainda ser outro motivo para explicar o fenómeno de morte celular das linhas obtidas após transformação. Como referido na Introdução, este gene interage com diversos outros genes (Liu et al., 2012; Ma et al., 2013; To et al., 2011). Recentemente, foi descoberta uma interação de *HDA6* com a cinase BIN2, cinase que participa na via de sinalização dos brassinosteróides (Hao et al., 2016). Os brassinosteróides desempenham um papel muito importante em funções que afetam o alongamento e divisão celulares (Tang et al., 2016). Um estudo mais aprofundado das diferentes interações entre *HDA6* e genes envolvidos no desenvolvimento celular podem fornecer uma explicação para este fenómeno.

Seria ainda esperado, devido à elevada homologia que existe em cada classe da HDACs (Ma et al., 2013), que existisse algum tipo de redundância funcional entre *HDA6* e outras desacetilases, não ocorrendo assim morte celular através do desempenho de funções de *HDA6* por outras desacetilases. Por exemplo, foi descrito que *HDA6* e *HDA19* podem ter um papel redundante em resposta a *stress* abiótico (Chen & Wu, 2010). No entanto, em ratos, já foi demonstrado que cada membro de uma classe específica de HDACs tem um papel único ao nível do controlo de expressão génica (Haberland et al., 2009). Observando as linhas transformadas com pFGC-pcoCas9+gRNA2 e a linha BT, é possível sugerir que, neste caso, *HDA6* não possui um papel de redundância funcional com outra histona desacetilase.

Como referido anteriormente, foram efetuadas duas transformações em BY-2 *wild type*, sem sucesso. Este fenómeno pode estar relacionado com a integração do gene *L-PGDS* aquando da transformação de BY-2 *wild type* com este transgene. Para o esclarecimento desta hipótese, seria interessante, no futuro, determinar a localização de *L-PGDS* no genoma de BY-2. O facto do sistema CRISPR-Cas9 poder efetuar mutações *off-target* ao longo do genoma pode também ser uma elucidação quando se compara a linha BT antes e depois da transformação. Os efeitos *off-target* do sistema CRISPR-Cas9 já foram reportados em diversos artigos de investigação (Bortesi & Fischer, 2015; Endo et al., 2015; Hille & Charpentier, 2016; Hsu et al., 2014). Para ultrapassar este problema, podem utilizar-se ribonucleoproteínas que contêm a nuclease Cas9 e o gRNA (Liang et al., 2015; Liang et al., 2017). Ao utilizarem-se ribonucleoproteínas, o transgene não é integrado no genoma e assim diminuem-se as mutações *off-target* (Liang et al., 2015; Liang et al., 2017).

IV. Conclusões e Perspetivas Futuras

Este projeto teve como objetivo o estudo da inativação de um gene envolvido em processos epigenéticos, *HDA6*, utilizando a técnica CRISPR-Cas9, para a obtenção de um possível aumento da proteína recombinante prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS) em linhas celulares de tabaco. Esta proteína recombinante é a proteína mais abundante no líquido cefalorraquidiano, utilizada como biomarcador e com potencial para tornar-se uma ferramenta de investigação para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de diagnóstico, por exemplo, para a doença de Alzheimer.

As culturas de células vegetais BY-2 encontram-se bem estabelecidas em laboratório e por isso são utilizadas em *Molecular Farming*. A expressão heteróloga de proteínas em plantas oferece diversas vantagens em relação aos sistemas mais utilizados atualmente, principalmente devido ao custo reduzido, e por isso a expressão de proteínas terapêuticas em plantas apresenta uma abordagem interessante.

O trabalho desenvolvido ao longo desta tese teve como objetivo produzir mutações alvo no gene *HDA6* para tentar aumentar a quantidade de L-PGDS em culturas BY-2 previamente transformadas com o gene *L-PGDS*. Este aumento resultaria da inibição da desacetilação e consequente abertura da cromatina e, em simultâneo, da inativação de um gene descrito como causador de silenciamento de transgenes. Foi utilizada como estratégia de *knock-out* de *HDA6* o sistema CRISPR-Cas9, uma tecnologia capaz de editar o genoma de forma rápida e eficiente. Previamente, já tinha sido tentado no laboratório aumentar a quantidade de L-PGDS através da adição de inibidores de desacetilases de histonas no meio de cultura. Como esta abordagem indireta não resultou num aumento significativo, o passo seguinte foi tentar uma abordagem direta, desenvolvida ao longo deste estudo.

Para a concretização deste estudo, foram utilizadas culturas BY-2 que expressam L-PGDS secretada no meio de cultura (linha BT). Previamente à transformação por CRISPR-Cas9, foi efetuada uma caracterização dos parâmetros de crescimento desta cultura e foi confirmada a presença da proteína recombinante no meio de cultura por *western blot*.

O *knock-out* de *HDA6* foi conseguido através da criação de RNAs guia (gRNA), nomeadamente um gRNA dirigido para o sítio ativo da enzima HDA6 (gRNA2). Uma vez obtido o plasmídeo pFGC-pcoCas9 com o fragmento gRNA2, a linha BT foi transformada com *Agrobacterium* que continha esse plasmídeo. Paralelamente, foram transformadas culturas *wild type* com *Agrobacterium* que continha o mesmo plasmídeo, com o objetivo de gerar uma linha BY2 com a inativação de *HDA6* para posterior transformação com um transgene desejado. Após duas tentativas de transformação da cultura *wild type*, não se observou crescimento de *calli* em placas com meio MS sólido, o que indica que este gene parece estar envolvido em funções vitais

da célula. Quanto à linha BT, foi inicialmente observado crescimento de *calli* em placas de Petri com meio de seleção. No entanto, estas culturas não apresentaram um crescimento normal e acabaram por cessar qualquer divisão celular. A presença do transgene de CRISPR-Cas9 foi confirmada por PCR, indicando que ocorreu de facto integração no genoma destas linhas transgênicas.

Uma vez que as culturas líquidas obtidas não apresentavam qualquer tipo de desenvolvimento e crescimento, a concentração de glufosinato de amónio foi reduzida, mas as culturas líquidas continuaram com o mesmo padrão de desenvolvimento. Para confirmar se tinha ocorrido morte celular, foi analisada a viabilidade celular das linhas transformadas. Todas as células analisadas apresentavam morte celular. Este fenómeno pode estar relacionado com diversos fatores: utilização de concentrações tóxicas do herbicida de seleção glufosinato de amónio; inativação do gene *HDA6* através do sistema CRISPR-Cas9 e subsequente alteração ao nível do desenvolvimento; o knock-out de *HDA6* pode levantar a repressão génica desta desacetilase sobre alguns genes que podem causar mutações; efeitos *off-target* do sistema CRISPR-Cas9; a interação de *HDA6* com outros genes que podem afetar o desenvolvimento e crescimento celulares, levando à morte celular. É necessário repetir a transformação e analisar as linhas transgênicas a nível molecular, averiguando se ocorreu o *knock-out* da *HDA6* através de sequenciação.

Para trabalho futuro, deverão ser efetuadas novas transformações para a obtenção dos 3 plasmídeos originalmente pretendidos e ver qual o efeito de gRNA1 e gRNA1+gRNA2 nas linhas transgênicas obtidas.

No que respeita à transformação das culturas BT e *wild type*, trabalho futuro deverá contemplar uma otimização das condições ideais para a mesma, nomeadamente, a concentração de glufosinato de amónio utilizada, pois existem artigos que utilizam concentrações mais reduzidas deste antibiótico em outros tipos de células vegetais (Cao et al., 1992; Kaeppler et al., 1992; Tan et al., 2005; Vasil et al., 1992) comparativamente com as utilizadas neste estudo. Paralelamente, poderá ser retirada a região que confere seleção a glufosinato de amónio no plasmídeo pFGC-pcoCas9 e adicionar-se outra marca de seleção mais comum, para que se saiba desde o início qual a concentração mais adequada a utilizar. Se for possível a obtenção de culturas transformadas com um crescimento estável, deverá ser realizada uma nova caracterização desta linha, bem como uma análise à acetilação das histonas e metilação do DNA, uma vez que *HDA6* interage com uma metiltransferase (*MET1*) para o silenciamento de transposições através da modulação da metilação de DNA e acetilação de histonas (Liu et al., 2012).

Os resultados preliminares obtidos podem servir como base para trabalhos futuros neste âmbito. Uma vez estabelecida uma linha BT sem atividade da *HDA6* como prova de conceito, deverá ser gerada uma linha WT sem atividade de *HDA6* para posterior transformação com genes que codificam proteínas com valor importante para a indústria farmacêutica.

V. Bibliografia

- Abranches, R., Shultz, R. W., Thompson, W. F., & Allen, G. C. (2005). Matrix attachment regions and regulated transcription increase and stabilize transgene expression. *Plant Biotechnology Journal*, 3, 535–543.
- Allfrey, V., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, 786–794.
- Amaro, A., Petretto, A., Angelini, G., & Pfeffer, U. (2016). Advancements in Omics Sciences. In *Translational Medicine: Tools and Techniques*, 67–108. Oxford: Academic Press.
- Aoki, S., & Ito, M. (2000). Molecular phylogeny of *Nicotiana* (Solanaceae) based on the nucleotide sequence of the matK gene. *Plant Biology*, 2, 316–324.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 76–84.
- Bender, J. (2002). Plant epigenetics. *Current Biology*, 12, 412–414.
- Bill, R. M. (2014). Playing catch-up with *Escherichia coli*: Using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–5.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., et al. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, 326, 1509–1512.
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33, 41–52.
- Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassié, L., Nadi, R., et al. (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 2203–2216.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Buyel, J. F. (2015). Process development strategies in plant molecular farming. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16, 966–982.
- Cao, J., Duan, X., McElroy, D., & Wu, R. (1992). Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports*, 11, 586–591.
- Castilho, A., & Steinkellner, H. (2012). Glyco-engineering in plants to produce human-like N-glycan structures. *Biotechnology Journal*, 7, 1088–1098.
- Chen, H. (2011). Surrogate Marker of Renal Function versus Prognostic Indicator. *American College of Cardiology*, 57, 859–860.
- Chen, L. T., Luo, M., Wang, Y. Y., & Wu, K. (2010). Involvement of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. *Journal of Experimental Botany*, 61, 3345–3353.
- Chen, L. T., & Wu, K. (2010). Role of histone deacetylases HDA6 and HDA19 in ABA and abiotic stress response. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 1318–1320.
- Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21,

- 5483–5495.
- Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6, 219.
- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnology Journal*, 3, 90–97.
- Dirisala, V. R., Nair, R. R., Srirama, K., Reddy, P. N., Rao, K. R. S. S., Satya Sampath Kumar, N., & Parvatam, G. (2017). Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 1–9.
- Earley, K., Lawrence, R. J., Pontes, O., Reuther, R., Enciso, A. J., Silva, M., et al. (2006). Erasure of histone acetylation by Arabidopsis HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes and Development*, 20, 1283–1293.
- Endo, M., Mikami, M., & Toki, S. (2015). Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations of the CRISPR / Cas9 System in Rice. *Plant and Cell Physiology*, 56, 41–47.
- Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V., & Michaud, D. (2005). Protein modifications in the plant secretory pathway: Current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine*, 23, 1770–1778.
- Filler, G., Kusserow, C., Lopes, L., & Kobrzyński, M. (2014). Beta-trace protein as a marker of GFR - History, indications, and future research. *Clinical Biochemistry*, 47, 1188–1194.
- Fischer, R., & Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, 9, 279–299.
- Fischer, R., Schillberg, S., Hellwig, S., Twyman, R. M., & Drossard, J. (2012). GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnology Advances*, 30, 434–439.
- Fischer, R., Vasilev, N., Twyman, R. M., & Schillberg, S. (2015). High-value products from plants: The challenges of process optimization. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 156–162.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31, 397–405.
- Gaj, T., Sirk, S. J., Shui, S., & Liu, J. (2016). Genome-Editing Technologies : Principles and Applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8, 1–20.
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., et al. (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 87, 99–110.
- Gellissen, G., Strasser, A. W. M., & Suckow, M. (2006). Key and criteria to the selection of an expression platform. In *Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Systems*, 1–5. Weinheim: Wiley-VCH.
- Gomord, V., & Faye, L. (2004). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 171–181.
- Gomord, V., Fitchette, A. C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., & Faye, L. (2010). Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 564–587.
- Grünewald, S., Huyben, K., de Jong, J. G., Smeitink, J. a, Rubio, E., Boers, G. H., et al. (1999). beta-Trace protein in human cerebrospinal fluid: a diagnostic marker for N-glycosylation defects in brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1455, 54–60.

- Haberland, M., Montgomery, R. L., & Olson, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics*, 10, 32–42.
- Hanania, U., Ariel, T., Tekoah, Y., Fux, L., Sheva, M., Gubbay, Y., et al. (2017). Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. *Plant Biotechnology Journal*, 15, 1120–1129.
- Hansson, S. F., Andréasson, U., Wall, M., Skoog, I., Andreasen, N., Wallin, A., et al. (2009). Reduced levels of amyloid-beta-binding proteins in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16, 389–97.
- Hao, Y., Wang, H., Qiao, S., Leng, L., & Wang, X. (2016). Histone deacetylase HDA6 enhances brassinosteroid signaling by inhibiting the BIN2 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 10418–10423.
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M., & Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*, 22, 1415–1422.
- Hiatt, A., Cafferkey, R., & Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, 76–78.
- Hille, F., & Charpentier, E. (2016). CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 20150496.
- Horn, M. E., Woodard, S. L., & Howard, J. A. (2004). Plant molecular farming: Systems and products. *Plant Cell Reports*, 22, 711–720.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157, 1262–1278.
- Jarvis, D. L. (2009). Baculovirus-Insect Cell Expression Systems. In *Methods in Enzymology*, 191–222. Elsevier Inc.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337, 816–821.
- Kaeppeler, H. E., Somers, D. A., Rines, H. W., & Cockburn, A. E. (1992). Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. *Theoretical and Applied Genetics*, 84, 560–566.
- Kaminskas, E., Farrell, A., Wang, Y.-C., Sridhara, R., & Pazdur, R. (2005). FDA Drug Approval Summary: Azacitidine (5-azacytidine, VidazaTM) for Injectable Suspension. *The Oncologist*, 10, 176–182.
- Kanekiyo, T., Ban, T., Aritake, K., Huang, Z.-L., Qu, W.-M., Okazaki, I., et al. (2007). Lipocalin-type prostaglandin D synthase/ β -trace is a major amyloid β -chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 6412–6417.
- Khan, K. H. (2013). Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3, 257–263.
- Kim, J. M., To, T. K., & Seki, M. (2012). An epigenetic integrator: New insights into genome regulation, environmental stress responses and developmental controls by HISTONE DEACETYLASE 6. *Plant and Cell Physiology*, 53, 794–800.
- Kim, Y.-G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 1156–1160.

- Kiziltepe, T., Hideshima, T., Catley, L., Raje, N., Yasui, H., Shiraishi, N., et al. (2007). 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 1718–1727.
- Klee, H. (2000). A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5, 446–451.
- Ko, K., Ahn, M.-H., Song, M., Choo, Y.-K., Kim, H. S., Ko, K., & Joung, H. (2008). Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants. *Molecules and Cells*, 25, 494–503.
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA Methylation and Cancer. In *Epigenetics and Cancer, Part A*, 27–56. Amsterdam: Academic Press.
- Li, J., Zhang, D., & Sheen, J. (2015). Targeted Plant Genome Editing via the CRISPR/Cas9 Technology. *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols*, 1284, 239–255.
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., et al. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*, 208, 44–53.
- Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., et al. (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*, 8, 14261.
- Liu, X., Yang, S., Yu, C.-W., Chen, C.-Y., & Wu, K. (2016). Histone Acetylation and Plant Development. In *The Enzymes*, 173–199. Elsevier Inc.
- Liu, X., Yu, C.-W., Duan, J., Luo, M., Wang, K., Tian, G., et al. (2012). HDA6 Directly Interacts with DNA Methyltransferase MET1 and Maintains Transposable Element Silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158, 119–129.
- Ma, X., Lv, S., Zhang, C., & Yang, C. (2013). Histone deacetylases and their functions in plants. *Plant Cell Reports*, 32, 465–478.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., et al. (2015). A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 8, 1274–1284.
- Mase, M., Yamada, K., Shimazu, N., Seiki, K., Oda, H., Nakau, H., et al. (2003). Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in cerebrospinal fluid: A useful marker for the diagnosis of normal pressure hydrocephalus. *Neuroscience Research*, 47, 455–459.
- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., & Matzke, A. J. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 367–376.
- Meco, C., Oberascher, G., Arrer, E., Moser, G., & Albegger, K. (2003). β -trace protein test: New guidelines for the reliable diagnosis of cerebrospinal fluid fistula. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 129, 508–517.
- Mercx, S., Smargiasso, N., Chaumont, F., De Pauw, E., Boutry, M., & Navarre, C. (2017). Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–11.
- Moustafa, K., Makhzoum, A., & Trémouillaux-Guiller, J. (2015). Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36, 1–11.
- Murfett, J., Wang, X. J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (2001). Identification of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *The Plant Cell*, 13, 1047–1061.

- Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 Cell Line as the “HeLa” Cell in the Cell Biology of Higher Plants. *International Review of Cytology*, 132, 1–30.
- Nevalainen, H., & Peterson, R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–10.
- Oakes, J., Shewmaker, C., & Stalker, D. (1991). Production of Cyclodextrins, a Novel Carbohydrate, in the Tubers of Transgenic Potato Plants. *Nature Biotechnology*, 9, 982–986.
- Orenes-Piñero, E., Manzano-Fernández, S., López-Cuenca, Á., Marín, F., Valdés, M., & Januzzi, J. L. (2013). β -trace protein: From GFR marker to cardiovascular risk predictor. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8, 873–881.
- Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15, 540–555.
- Pires, A. S., Santos, R. B., Nogueira, A. C., & Abranches, R. (2014). Production of human lipocalin-type prostaglandin D synthase in the model plant *Medicago truncatula*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50, 276–281.
- Quétier, F. (2015). The CRISPR-Cas9 technology: Closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing. *Plant Science*, 242, 65–76.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8, 2281–2308.
- Razin, A., & Riggs, A. (1980). DNA Methylation and Gene Function. *Science*, 210, 604–610.
- Rice, J. C., & Allis, C. D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: New insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 263–273.
- Rushton, P. J., Bokowiec, M. T., Han, S., Zhang, H., Brannock, J. F., Chen, X., et al. (2008). Tobacco Transcription Factors: Novel Insights into Transcriptional Regulation in the Solanaceae. *Plant Physiology*, 147, 280–295.
- Sahu, P. P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*, 32, 1151–1159.
- Santos, R. B., Abranches, R., Fischer, R., Sack, M., & Holland, T. (2016). Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–12.
- Schaeffer, S. M., & Nakata, P. A. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Science*, 240, 130–142.
- Schillberg, S., Emans, N., & Fischer, R. (2002). Antibody molecular farming in plants and plant cells. *Phytochemistry Reviews*, 1, 45–54.
- Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 363–372.
- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Heckl, D., et al. (2014). Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science*, 343, 84–87.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., et al. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31, 686–688.
- Shi, J., Wang, E., Milazzo, J. P., Wang, Z., Kinney, J. B., & Vakoc, C. R. (2015). Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. *Nature Biotechnology*, 33, 661–667.

- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J., Chames, P., et al. (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research*, 34, 1–12.
- Strasser, R., Altmann, F., & Steinkellner, H. (2014). Controlled glycosylation of plant-produced recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 95–100.
- Sun, J. K., Eun, Y. C., Yoon, J. C., Ji, H. A., & Park, O. K. (2006). Proteomics studies of post-translational modifications in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1547–1551.
- Tan, C., Qin, S., Zhang, Q., Jiang, P., & Zhao, F. (2005). Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *The Journal of Microbiology*, 43, 361–365.
- Tanaka, M., Kikuchi, A., & Kamada, H. (2007). The Arabidopsis Histone Deacetylases HDA6 and HDA19 Contribute to the Repression of Embryonic Properties after Germination. *Plant Physiology*, 146, 149–161.
- Tang, J., Han, Z., & Chai, J. (2016). Q&A: what are brassinosteroids and how do they act in plants? *BMC Biology*, 14, 1–5.
- Taniguchi, H., Mohri, I., Okabe-Araori, H., Kanekiyo, T., Kagitani-Shimono, K., Wada, K., et al. (2007). Early induction of neuronal lipocalin-type prostaglandin D synthase after hypoxic-ischemic injury in developing brains. *Neuroscience Letters*, 420, 39–44.
- Taniike, M., Mohri, I., Eguchi, N., Beuckmann, C. T., Suzuki, K., & Urade, Y. (2002). Perineuronal oligodendrocytes protect against neuronal apoptosis through the production of lipocalin-type prostaglandin D synthase in a genetic demyelinating model. *The Journal of Neuroscience*, 22, 4885–4896.
- Tekoah, Y., Shulman, A., Kizhner, T., Ruderfer, I., Fux, L., Nataf, Y., et al. (2015). Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture-the protalix experience. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 1199–1208.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 211–222.
- Tian, L., & Chen, Z. J. (2001). Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 200–205.
- To, T. K., Kim, J. M., Matsui, A., Kurihara, Y., Morosawa, T., Ishida, J., et al. (2011). Arabidopsis HDA6 Regulates Locus-Directed Heterochromatin Silencing in Cooperation with MET1. *PLoS Genetics*, 7, e1002055.
- Twyman, R. M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., & Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, 21, 570–578.
- Urade, Y., & Eguchi, N. (2002). Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 68–69, 375–382.
- Urade, Y., & Hayaishi, O. (2000). Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, 259–271.
- Urade, Y., & Hayaishi, O. (2000). Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitamins and Hormones*, 58, 89–120.
- Vasil, V., Castillo, A., Fromm, M., & Vasil, I. (1992). Herbicide Resistant Fertile Transgenic

- Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus. *Nature Biotechnology*, 10, 667–674.
- Verdin, E., & Ott, M. (2014). 50 Years of Protein Acetylation: From Gene Regulation To Epigenetics, Metabolism and Beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 258–264.
- Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, 24, 1241–1252.
- Wang, T., Wei, J., Sabatini, D., & Lander, E. S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science*, 343, 80–84.
- Wilken, L. R., & Nikolov, Z. L. (2012). Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 30, 419–433.
- Wilson, S. A., & Roberts, S. C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 249–268.
- Wu, K., Zhang, L., Zhou, C., Yu, C. W., & Chaikam, V. (2008). HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 59, 225–234.
- Xin, X., Huber, A., Meyer, P., Flammer, J., Neutzner, A., Miller, N. R., & Killer, H. E. (2009). L-PGDS (Betatrace Protein) Inhibits Astrocyte Proliferation and Mitochondrial ATP Production in Vitro. *Journal of Molecular Neuroscience*, 39, 366–371.
- Xu, J., Dolan, M. C., Medrano, G., Cramer, C. L., & Weathers, P. J. (2012). Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 30, 1171–1184.
- Xu, J., Ge, X., & Dolan, M. C. (2011). Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances*, 29, 278–299.
- Xu, J., Towler, M., & Weathers, P. J. (2016). Bioprocessing of Plant In Vitro Systems. In *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*, 1–40. Springer International Publishing.
- Yao, J., Weng, Y., Dickey, A., & Wang, K. Y. (2015). Plants as factories for human pharmaceuticals: Applications and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 28549–28565.
- Zhang, X. (2008). The Epigenetic Landscape of Plants. *Science*, 320, 489–492.



VI. Anexos

1. Reagentes e Soluções

1.1. Preparação de soluções para géis de proteínas

Tampão para gel de concentração SDS-PAGE

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

Dissolver tris-base (NZYTech, Portugal) em água destilada. O pH é ajustado com HCl 1 M (Riedel-de Haën, Alemanha) com a ajuda de um medidor de pH (pH Meter Basic 20, Crison, Espanha) para 6.8 e adiciona-se água destilada ao volume final. A solução é armazenada a 4°C.

Tampão para gel de resolução SDS-PAGE

3 M Tris-HCl (pH 8.8)

Dissolver tris-base em HCl 1 M. Adicionar água destilada ao volume final e ajustar o pH para 8.8. A solução é armazenada a 4°C.

10% Dodecil sulfato de sódio (SDS)

Dissolver 10 g de SDS em 1 L de água destilada. Aquecer para dissolver. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

1.5% Persulfato de amónio (APS)

Dissolver 0.15 g de persulfato de amónio em 10 mL de água destilada. A solução é armazenada a -20°C.

Tampão de corrida (10x concentrado)

250 mM Tris-base

1% (v/v) SDS

1.92 M Glicina (NZYTech, Portugal)

Dissolver tris-base e glicina em água destilada e adicionar o SDS. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

Tampão de amostra (4x concentrado)

40% (v/v) Glicerol (Scharlau, Espanha)

320 mM Tris-HCl (pH 6.8)

8% (w/v) SDS

0.04% (w/v) Azul de bromofenol (Merck, EUA)

20% (w/v) β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA)

Perfazer até ao volume final com água destilada. A solução é armazenada a -20°C.

1.2. Preparação de soluções para transferência e detecção de proteínasTampão de transferência de proteínas

10% (v/v) Tampão de corrida (10x concentrado)

20% (v/v) Metanol (Carlo Erba, Itália)

Diluir o metanol e o tampão de corrida em água destilada. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

Tampão fosfato salino (PBS) (10x concentrado)

1.38 M NaCl

27 mM KCl (Carl Roth, Alemanha)

101 mM Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, EUA)

15 mM KH_2PO_4 (Riedel-de Haën, Alemanha)

Dissolver os reagentes em água destilada. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

PBS-T: Diluir 0.1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS 1x.

Solução de bloqueio da membrana de nitrocelulose

3% Albumina de soro bovino (NZYTech, Portugal)

5% Leite em pó Molico (Nestlé, Suíça)

Dissolver a albumina de soro bovino e o leite em pó em PBS-T. A solução é preparada imediatamente antes de ser utilizada.

Tampão de detecção de proteínas NBT/BCIP

100 mM Tris-HCl (pH 9.5)
10 mM NaCl
50 mM MgCl₂

Dissolver os reagentes em água destilada. A solução é armazenada a 4°C.

Solução de detecção de proteínas NBT/BCIP

6.6 µL/mL NBT (Promega, EUA)
3.3 µL/mL BCIP (Promega, EUA)

Adicionar NBT e BCIP ao tampão NBT/BCIP, num microtubo coberto com papel de alumínio. Preparar a solução imediatamente antes de ser utilizada.

1.3. Preparação de soluções para extração de DNA

Tampão de extração de DNA genómico de células vegetais

200 mM Tris-HCl (pH 7.5)
250 mM NaCl
25 mM EDTA (VWR, EUA)
0.5% (w/v) SDS

Dissolver os reagentes em água destilada. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

Tampão Tris-EDTA

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA

Dissolver os reagentes em água destilada. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

1.4. Preparação de meios de cultura para cultura de tecidos

Meio Murashige & Skoog (MS) (20x concentrado)

Dissolver 215.1 g de MS (Duchefa Biochemie, Holanda) em 2.5 L de água destilada. A solução é transferida para tubos de 50 mL e armazenados a -20°C.

Meio de cultura MS para *N. tabacum* BY2

50 mL de solução stock MS (20x concentrado)
3% (w/v) Sacarose (Duchefa Biochemie, Holanda)
555 µM Mio-inositol (Sigma-Aldrich, EUA)
1.46 mM KH₂PO₄
1 mg/L Tiamina (Sigma-Aldrich, EUA)
0.2 mg/L 2,4-D (Sigma-Aldrich, EUA)

Dissolver os reagentes em água destilada. Ajustar o pH para 5.8 com KOH 1 M (Riedel-de Haën, Alemanha). Autoclavar. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

MS Gelrite: Diluir 0.4% de gelrite (Duchefa Biochemie, Holanda) em meio de cultura MS. Autoclavar. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

1.5. Preparação de soluções para microbiologia

Meio Luria-Bertani (LB)

25 g/L LB granulado (NZYTech, Portugal)

Dissolver LB granulado em água destilada e ajustar o pH para 7.2. Adicionar água destilada ao volume final. Autoclavar. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

LB sólido: Adicionar 15 g/L de agar (Duchefa Biochemie, Holanda). Autoclavar. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

Glycerol stock media para *E. coli*

50% Glicerol
100 mM MgSO₄
25 mM Tris-base

Dissolver tris-base em água destilada e adicionar MgSO₄ e o glicerol. Filtrar com a ajuda de uma seringa e de um filtro com 0.2 µm de poro. Armazenar à temperatura ambiente.

1.6. Preparação de soluções para géis de DNA

Tris/Borato/EDTA (TBE) (5x concentrado)

446 mM Tris-base

445 mM Ácido bórico (Merck, EUA)

0.5% EDTA 0,2 M (pH 8)

Dissolver os reagentes em água destilada. Autoclavar. Armazenar à temperatura ambiente.

Agarose 0.8%

10% TBE 5x

0.8% Agarose (NZYTech, Portugal)

Adicionar o TBE e a agarose e perfazer com água destilada até ao volume final. Aquecer até dissolução total da agarose. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

Agarose 1.6%

10% TBE 5x

1.6% Agarose

Adicionar o TBE e a agarose e perfazer com água destilada até ao volume final. Aquecer até dissolução total da agarose. A solução é armazenada à temperatura ambiente.

Orange G (10x concentrado)

4.4 mM *Orange G* (Sigma-Aldrich, EUA)

30% (v/v) Glicerol

Dissolver o *Orange G* em água destilada e adicionar o glicerol. A solução é armazenada a 4°C.

1.7. Preparação de antibióticos

Canamicina (100 mg/mL)

Adicionar 1 g de canamicina (Duchefa Biochemie, Holanda) e perfazer com água destilada para um volume final de 10 mL. Filtrar com a ajuda de uma seringa e de um filtro com 0.2 µm de poro. Aliquotar em tubos de 1.5 mL estéreis e armazenar a -20°C.

Rifampicina (100 mg/mL)

Adicionar 1 g de rifampicina (NZYTech, Portugal) e perfazer com DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) para um volume final de 10 mL. Aliquotar em tubos de 1.5 mL estéreis e armazenar a -20°C.

Timentina (500 mg/mL)

Adicionar 5 g de timentina (Duchefa Biochemie, Holanda) e perfazer com água destilada para um volume final de 10 mL. Filtrar com a ajuda de uma seringa e de um filtro com 0.2 µm de poro. Aliquotar em microtubos de 1.5 mL estéreis e armazenar a -20°C.

Glufosinato de amónio (10 mg/mL)

Adicionar 100 mg de canamicina (Sigma-Aldrich, EUA) e perfazer com água destilada para um volume final de 10 mL. Filtrar com a ajuda de uma seringa e de um filtro com 0.2 µm de poro. Aliquotar em tubos de 1.5 mL estéreis e armazenar a -20°C.

1.8. Preparação de soluções para viabilidade celularCorante azul tripano

4% (w/v) Azul tripano (Sigma-Aldrich, EUA)

Dissolver o azul tripano em PBS-T 1x. A solução é armazenada à temperatura ambiente.